

THESIS

MUNICH

1967

ELEKTROPHORESE IM STÄRKEGEL:

Methodik und Anwendung bei normalen gamma-Globulinen  
und Paraproteinen

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR DRIVE  
PALO ALTO, CALIF. 94304

Edeltraud Grube





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA40153723\\_0182](https://archive.org/details/IA40153723_0182)



ELEKTROPHORESE IM STÄRKEGEL:

Methodik und Anwendung bei normalen gamma-Globulinen  
und Paraproteinen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Edeltraud G r u b e  
aus Nürnberg  
München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München

|                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| Berichterstatter:    | Priv. -Doz. Dr. M. Knedel |
| Mitberichterstatter: | Professor Dr. H. Schwiegk |
| Dekan:               | Professor Dr. M. Kiese    |

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1967

# I N H A L T

|                                                             | Seite |
|-------------------------------------------------------------|-------|
| I. EINLEITUNG                                               | 5     |
| II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN                                 | 6     |
| A. DER ELEKTROPHORESE IM STÄRKEGEL                          | 7     |
| 1. elektrophoretischer Transport                            | 7     |
| 2. elektroosmotischer Transport                             | 9     |
| 3. Adsorption                                               | 12    |
| 4. Effekt der Gelfiltration                                 | 13    |
| 5. zur apparativen Anordnung                                | 20    |
| B. DER SUBFRAKTIONIERUNG DER PROTEINE                       | 22    |
| 1. Dissoziierung mit Harnstoff                              | 23    |
| 2. Reduktion der Proteine                                   | 24    |
| 3. Alkylierung mit $\alpha$ -Halogen-Fettsäuren             | 25    |
| III. METHODIK                                               |       |
| A. DER STÄRKEGEL-ELEKTROPHORESE NACH SMITHIES O.            | 27    |
| 1. Material                                                 | 27    |
| 2. Geräte                                                   | 28    |
| 3. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials                  | 29    |
| 4. Arbeitsgang                                              | 30    |
| B. DER HARNSTOFF-STÄRKEGEL-ELEKTROPHORESE NACH POULIK M. D. | 40    |
| 1. Material                                                 | 40    |
| 2. Geräte                                                   | 40    |
| 3. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials                  | 41    |
| 4. Arbeitsgang                                              | 42    |

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV. VERSUCHE zur Darstellung und Untersuchung von gamma-Globulinen mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese (S. G. E.)                              | 45 |
| A. UNTERSUCHUNGSGUT                                                                                                                               | 45 |
| 1. Vollseren von 4 Gesunden, 4 Patienten mit $\gamma_G$ -Plasmocytom, 2 Patienten mit $\gamma_A$ -Plasmocytom, 4 Patienten mit Morbus Waldenström | 45 |
| 2. Isolierte Serumweißfraktionen                                                                                                                  | 45 |
| a. 1 normale $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion                                                                                                        | 45 |
| b. 4 pathologische $\gamma_G$ -Globulin-Fraktionen ( $\gamma_G$ -Plasmocytom)                                                                     | 46 |
| c. 4 $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe, isoliert aus Patientenserum, bei Morbus Waldenström                                                           | 46 |
| B. VERSUCHSERGEBNISSE UND DISKUSSION                                                                                                              | 48 |
| 1. S. G. E. unter verschiedenen Versuchsbedingungen                                                                                               | 48 |
| 2. Einfüllen eines Serum-Gel-Gemisches in den Depotspalt                                                                                          | 51 |
| 3. S. G. E. : 4 Normalserum und 1 normales $\gamma_G$ -Globulin                                                                                   | 53 |
| 4. S. G. E. : 4 $\gamma_G$ -Plasmocytom-Seren, isolierte pathologische $\gamma_G$ -Globuline                                                      | 55 |
| 5. S. G. E. : 2 $\gamma_A$ -Plasmocytom-Seren                                                                                                     | 59 |
| 6. S. G. E. : 4 $\gamma_M$ -Patientenserum (Morbus Waldenström) und $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe                                                 | 61 |
| 7. Lokalisation der gamma-Globulin-Anteile                                                                                                        | 63 |
| 8. S. G. E. : Dissoziationsprodukte eines normalen $\gamma_G$ -Globulins                                                                          | 65 |
| 9. S. G. E. : Dissoziationsprodukte von 4 $\gamma_M$ -Globulin-Komplexen                                                                          | 69 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                                                | 73 |
| Abbildungsverzeichnis                                                                                                                             | 76 |
| Figurenverzeichnis                                                                                                                                | 79 |
| Tabelle                                                                                                                                           | 82 |
| Abbildungen                                                                                                                                       | 83 |
| Literaturverzeichnis                                                                                                                              | 98 |

## I. EINLEITUNG

Das Verfahren der Zonenelektrophorese im Stärkegel nach SMITHIES O. (143, 142, 144) ist zur Selektivierung einzelner Komponenten eines Proteingemisches augenblicklich die optimale Methode, welche neben der spezifischen Nettoladung zugleich Molekülgröße und -Gestalt der Proteinteile berücksichtigt. Der Vorzug gegenüber den herkömmlichen elektrophoretischen Methoden ist dabei in dem Effekt der sog. "Gelfiltration" des Trägermaterials begründet.

Die Stärkegel-Elektrophorese ermöglicht durch die Charakterisierung von Proteinen nach diesen Gesichtspunkten eine Bestätigung sowie Ergänzung bisheriger Ergebnisse in der Forschung der Proteinchemie mit herkömmlichen Analyseverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wird, mit Hilfe einer eigenen Abänderung der Methode von SMITHIES O., das stärkegelelektrophoretische Verhalten von nativen gamma-Globulinen im Verband aller Serumkomponenten, sowie von isolierten gamma-Globulin-Fractionen aufgezeigt. Es werden normale gamma-Globuline sowie  $\gamma_G^-$ ,  $\gamma_A^-$  und  $\gamma_M^-$  - Paraproteine untersucht.

Außerdem sollen durch Reduktion und Alkylierung artefiziell erhaltene Proteinuntereinheiten eines normalen  $\gamma_G^-$ -Globulins und von 4 abnormen  $\gamma_M^-$ -Globulin-Komplexen (bei Morbus Waldenström) dargestellt werden.

## II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Man ist heute in der Lage, die Eiweißkörper des Blutserums auf Grund von spezifischen physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten zu charakterisieren und darzustellen. Es werden 4 Möglichkeiten zur Trennung von Eiweißkörpern bevorzugt:

### auf Grund ihrer verschiedenen elektrischen Ladungen

- im elektrischen Gleichstromfeld
  - durch die trägerfreie Elektrophorese (55)
  - auf verschiedenen Trägermedien;  
die Wichtigsten sind: Papier (52, 162, 76, 53), Stärke (78, 96, 14, 39), Agar (33), Cellulosepulver (163, 27), Polyvinylchlorid (79, 95), Celluloseacetat (71), Agargel (166, 49), Stärkegel (142, 144), Polyacrylamidgel (121), Sephadexgel (40).
- bei der Ionenaustauschchromatographie
  - in hydrophilen oder hydrophoben Trägern mit der Funktion eines Anionen- oder Kationenaustauschers.

### auf Grund verschiedener Größe, Form und Struktur der Moleküle (Siebeffekt)

- in Kombination mit dem Effekt der Adsorption und insbesondere des Ionenaustausches.  
Bei Kunsthharzen, Celluloseaustauschern und vor allem ausgeprägt bei Sephadex (105) als Träger.
- in Kombination mit elektrophoretischen Prozessen, besonders deutlich bei Gelen als Trägersubstanz.  
Agargel (166, 49), Sephadex (40), Stärkegel (142, 144), Polyacrylamidgel (121).

### auf Grund verschiedener Molekulargewichte

- im Schwerfeld der Ultrazentrifuge nach SVEDBERG (151).

### auf Grund ihrer Eigenschaft, als Antigene mit spezifischen Antikörpern eine Präzipitation einzugehen.

- von besonderer Bedeutung in Kombination mit einer Elektrophorese in Agargel (GRABAR P. und WILLIAMS C. A., 51).

Die Trennung von Proteinen wegen ihrer verschiedenen Ladungen im elektrischen Feld und zugleich durch den Effekt der sog. "Gelfiltration" des Trägermediums ist in der Methode der Stärkegelelektrophorese (S. G. E.) kombiniert. BERNFIELD P. und NISSELBAUM J. S. (7) beschrieben erstmals die elektrophoretische Trennung einer größeren Proteinmenge im Stärkegel.

SMITHIES O. (142, 144, 143) baute diese Möglichkeit aus zu einer gängigen Untersuchungsmethode zur Analyse von Serumproteinen.

A. Die wichtigsten theoretischen Grundlagen der Elektrophorese im Stärkegel seien zunächst eingehender dargestellt

### 1. elektrophoretischer Transport

Voraussetzung jeder elektrophoretischen Wanderung von Proteinen ist, daß die kolloidal gelösten Proteine infolge Dissoziation ionisierbarer Gruppen elektrisch geladen sind. Im elektrischen Gleichstromfeld erfolgt eine differenzierende Auftrennung der quantitativ und qualitativ unterschiedlich geladenen Proteine nach dem Gesichtspunkt der Art der Ladung, indem sie kathodisch oder anodisch wandern, und der Höhe der Ladung, indem sie mit verschiedener Geschwindigkeit transportiert werden.

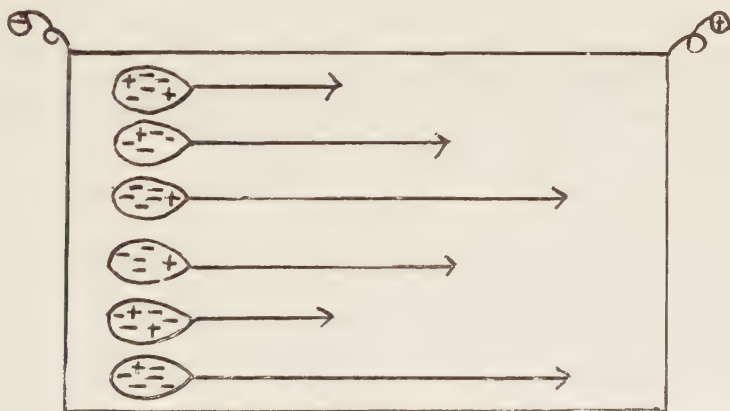


Fig. 1 : Schema der Elektrophorese.  
(aus KARLSON, Lehrbuch der Biochemie)

Die effektive Ladung hängt dabei in erster Linie vom pH-Wert des Mediums ab.

Die Proteine besitzen ionisierbare Gruppen mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten, die Carboxyl- und Aminogruppen der Peptidketten und saure und basische Seitengruppen der am Peptidaufbau beteiligten Aminosäuren; Proteine mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung differieren also bei einem bestimmten pH-Wert in der Anzahl der effektiven Ladungen.

Außerdem ist zu beachten, daß die Proteine amphoteren Charakter besitzen, so daß je nach Lage des pH-Wertes eine positive oder negative Gesamtladung des Proteinmoleküls resultiert.

Die Nettoladung eines Proteins, d. h. die Summe und die Art der effektiven Ladung ist also bestimmt von dem pH-Wert des Mediums, der Dissoziationskonstanten der ionisierbaren Gruppen und dem isoelektrischen Punkt eines Proteins.

(folgende Ableitung ist weitgehend BEHRING-Sonderdruck, 3, entnommen).  
Ein solches geladenes Teilchen mit  $z$  Elementarladungen  $e$  wird im gleichgerichteten elektrischen Feld  $E$  in Richtung Kathode oder Anode beschleunigt von einer Kraft  $K$

$$K = z \cdot e \cdot E$$

Durch Reibung des bewegten Teilchens an Molekülen im Medium erreicht es eine stationäre Geschwindigkeit  $w$ , welche der Kraft  $K$  direkt proportional und der Reibungskonstanten  $R = 6\eta\pi r$  (bei einem kugelförmigen Teilchen im homogenen Medium) umgekehrt proportional ist.

$$w = \frac{K}{R}$$

$$w = \frac{z \cdot e \cdot E}{6\eta\pi r}$$

$\eta$  = Viskosität des Mediums.

Wird diese stationäre Geschwindigkeit  $w$  auf das elektrische Einheitsfeld  $E = 1 \left| \frac{\text{V}}{\text{cm}} \right|$  bezogen, so erhält man die sog. Wanderungsgeschwindigkeit bzw. elektrophoretische Beweglichkeit  $= u$ , eine für das betreffende Teilchen

charakteristische Größe.

$$U = \frac{w}{E}$$

$$U = \frac{z \cdot e_0}{e \cdot D \cdot r}$$

Unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der ionalen Konzentration der Lösung bei Erhaltung aller sonstigen veränderlichen Bedingungen muß die Formel noch folgendermaßen erweitert werden:

$$w = \frac{\epsilon \cdot E \cdot \xi}{4 \pi \eta} \cdot f(\kappa a, \xi)$$

$\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante,  $f\xi$  = Funktion des Zeta -Potentials,  $\kappa a$  = Funktion des Radius der Ionenwolke.

Die Korrekturgrößen ergeben sich aus folgender Überlegung:

die gelösten Moleküle bzw. Ionen der Lösung behindern sich durch gegenseitige Einwirkung in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit; der Effekt ist umso ausgeprägter, je höher die sog. Ionenstärke ist. Dies ist berücksichtigt in dem Faktor  $\kappa a$ , der Funktion der Ionenwolke.

Üblicherweise arbeitet man bei der Elektrophorese mit einer Ionenstärke unter  $\mu = 0,1$ .

Die Funktion des Zeta -Potentials  $f\xi$  wird im folgenden Abschnitt des elektroosmotischen Transportes erläutert.

## 2. elektroosmotischer Transport

Auf die Elektrophorese hat das Zeta -Potential, auch elektrokinetisches Potential genannt, einen entscheidenden Einfluß. Dieses bildet sich aus an der Phasengrenze bewegl., elektr. geladenes Proteinteilchen/Elektrolytlösung und an der Phasengrenze Trägersubstanz/Elektrolytlösung. Ursache dafür ist eine elektrisch geladene Doppelschicht, welche durch Ionenadsorption aufgebaut wird.

Unter den üblichen Versuchsbedingungen der Zonenelektrophorese, also im alkalischen Milieu, lädt sich der Träger - z.B. bei der S.G.E. das poröse kapillare System - negativ auf; ebenso erhalten die Proteinteilchen, und zwar bei einem pH-Wert von 8,6 ausschließlich eine negative Ladung.

Die Theorie von STERN O. (150), eine Komposition der Theorie von HELMHOLTZ H. (56) und der von GOUY G. (50) CHAPMAN (15) erklärt das Zustandekommen dieser Doppelschicht:

Im alkalischen Milieu stehen der festen Phase mit negativer Ladung die positiv geladenen Ionen des Elektrolyten gegenüber. Durch elektrostatische und adsorptive Kräfte wird am Phasenübergang eine elektrisch geladene Doppelschicht ausgebildet. Mit zunehmendem Abstand von der unmittelbaren Phasengrenze nimmt die Dichte der Gegenionen infolge Abschwächung der elektrostatischen Wirkung kontinuierlich ab.

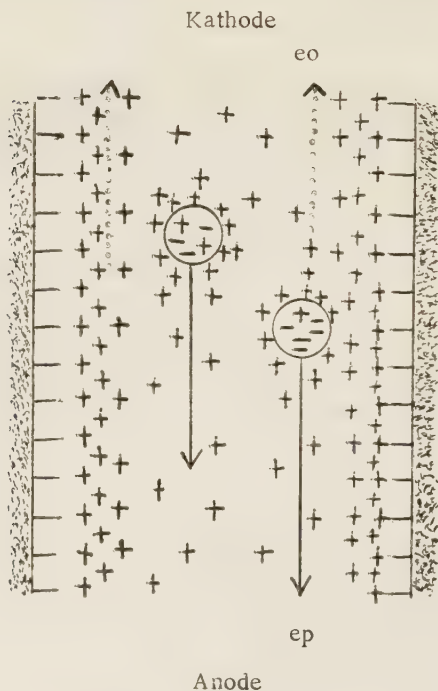


Fig. 2: Modell zur Darstellung der elektr. Doppelschichten

ep = elektrophoretischer Fluß  
eo = elektroosmotischer Fluß

Das ursprüngliche Spannungspotential an den Phasengrenzen erfährt dadurch eine Erniedrigung auf ein effektives Potential  $\zeta$ , und zwar um den Ladungsbetrag der Gegenionen innerhalb der Doppelschicht (4, 150, 119, 135, 89).

Das Zeta-Potential an der Phasengrenze geladene Trägersubstanz/Elektrolytlösung wird bezeichnet als  $\zeta_{\text{osm}}$ , das an der Phasengrenze elektrisch geladene Proteinteilchen /Elektrolytlösung als  $\zeta_{\text{el}}$ .

Eine direkte Folge eines Zeta-Potentials zwischen festen Teilchen und Lösung ist die Erscheinung der Elektroosmose, wenn ein äußeres elektrisches Feld angelegt wird. Wie das Modell zeigt, erfolgt bei den üblichen Bedingungen der Elektrophorese, nämlich im alkalischen Medium, ein elektrophoretischer Transport in zwei entgegengesetzten Richtungen:

der Transport von negativ aufgeladenen Proteinen in Richtung Anode, und zwar mit folgender Wanderungsgeschwindigkeit

$$w_{\text{el}} = \frac{e \cdot E \cdot \zeta}{4 \pi \eta} \quad (20, 5)$$

der Transport des Elektrolyten an der festen Phase vorbei in Richtung Kathode, mit der Wanderungsgeschwindigkeit

$$w_{\text{osm}} = \frac{2 \cdot E \cdot \zeta}{4 \pi \eta}$$

Es sei hier kurz berichtet, daß die kathodische Verschiebung des Hauptanteils der  $\gamma$ -Globulinkomponente bei der S.G.E. ihre Ursache im Phänomen der Elektroosmose hat.

Dieses Phänomen der Elektroosmose hat nur geringe Bedeutung (76) bei der freien Elektrophorese nach TISELIUS A. (155), macht sich dagegen bei der Zonelektrophorese deutlich bemerkbar; es ist verschieden stark ausgeprägt, je nach Trägersubstanz. Zahlreiche vergleichende Versuche zur Bestimmung des endosmotischen Effektes (135, 78, 119, 76) ergaben, daß bei konstanten Bedingungen die Relation von endosmotischer zu elektrophoretischer Wanderung ein für jeden Träger bestimmbarer konstanter Quotient (78, 135) ist, da  $\zeta_{\text{el}}$  sowie  $\zeta_{\text{osm}}$  vom pH-Wert und der Ionenstärke bestimmt werden.

KUNKEL H. G. und SLATER R. J. (78) verglichen bei mehreren Trägersubstanzen den elektroosmotischen Einfluß auf die elektrophoretische Wanderung von Proteinen und kamen unter anderem zu folgendem Versuchsergebnis,

|                 |     |
|-----------------|-----|
| filterpaper     | 1,5 |
| potato starch   | 2,5 |
| washed sea sand | 4,3 |
| 1 % agar        | 4,7 |

Die elektrophoretische Beweglichkeit  $U_{el}$  einer bestimmten Substanz, unter denselben Bedingungen aber in verschiedenen Trägermedien, ist indirekt ein Maß für die elektroosmotische Wirkung in dem betreffenden Medium. Von den angeführten Beispielen unterliegt (außer Filterpapier) die Stärke dem elektroosmotischen Phänomen am wenigsten.

### 3. Adsorption

Bei der Zonenelektrophorese beeinflusst weiterhin die Adsorption der Proteine am Träger den elektrophoretischen Trennungsvorgang; das Ausmaß dieses Effektes ist wiederum von pH-Wert und Ionenstärke abhängig und für den jeweiligen Träger eine spezifische Größe (128).

Mit eiweißgebundenen Farbstoffen, z. B. Kongorot, lassen sich die adsorptiven Eigenschaften der verschiedenen Träger gut demonstrieren (128). Derartige Untersuchungen geben Hinweis auf die Proteinadsorption.

Schematische Darstellung der Adsorption von Kongorot bei verschiedenen zonenelektrophoretischen Verfahren (128):

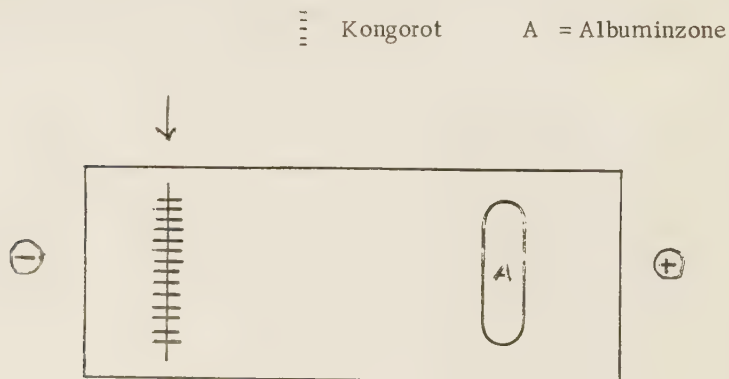


Fig. 3 a      bei Papier bleibt Kongorot an der Startstelle liegen.

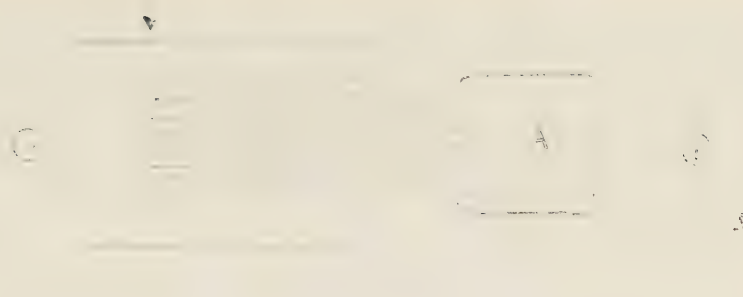


Fig. 3 b      bei Stärkegel wird Kongorot eine kleine Strecke von Albumin mitgeschleppt

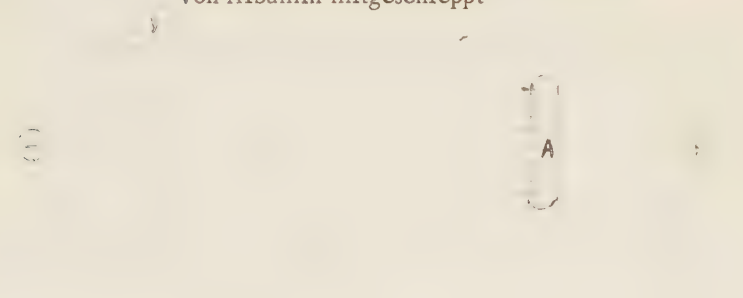


Fig. 3 c      im Agargel wird durch die Kongorot-Albuminbindung die Wanderungsgeschwindigkeit eher noch beschleunigt.

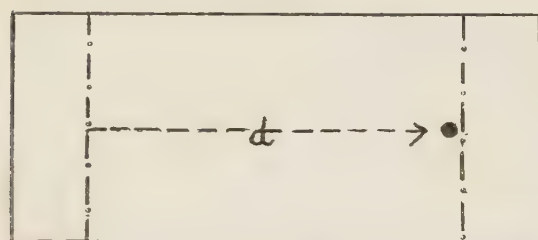
Bei diesen Beispielen (128) ist die Adsorption von Kongorot an Papier am stärksten, bei Stärkegel stark vermindert, bei Agargel beseitigt.

#### 4. Effekt der Gelfiltration

Abgesehen von dem relativ geringen elektroosmotischen und adsorptiven Effekt der Stärke als Trägermaterial zeichnet sich die Stärke in Gelform im Gegensatz zu den üblichen Trägersubstanzen bei der Elektrophorese zusätzlich durch einen Siebeffekt, eine sog. "Gelfiltration", auf die Proteinkomponenten aus.

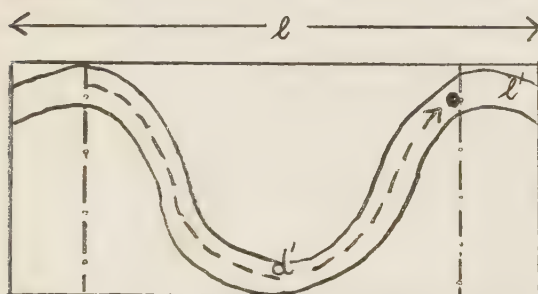
Auf Grund der Kombination der Auflösung durch elektrophoretische Beweglichkeit mit der Auflösung nach verschiedenen molekularen Dimensionen in Gelen als Träger resultiert, verglichen mit den herkömmlichen elektrophoretischen Auftrennungen, ein wesentlich breiteres Spektrum der Proteinauflösung. Augenblicklich sind es die Elektrophorese im Agargel (166, 49), im Stärkegel (142, 144) und ebenso im Polyacrylamidgel (121), die optimal jene Kombination erfüllen.

Die Wanderung der Proteine im Gel unterscheidet sich beträchtlich von jener im flüssigen Medium bei der freien Elektrophorese oder in den üblichen Trägern der Zonenelektrophorese. Folgende Schemata (Fig. 4) sollen die Vorstellung darüber kurz demonstrieren:

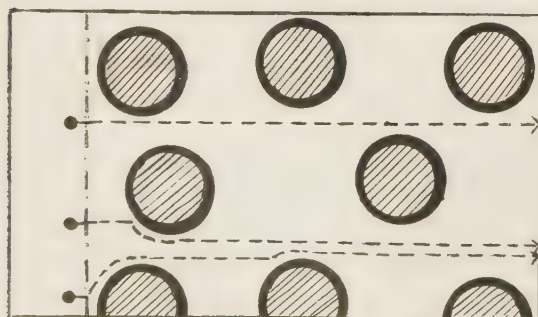


4a) freie Elektrophorese  
direkter Weg des Ions  
zur Elektrode

(TISELIUS A., 76)

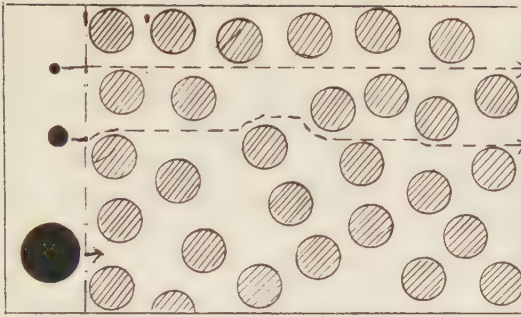


4b) Zonenelektrophorese  
auf Träger  
Ablenkung des Ions vom  
direkten Weg.



α) durch die vorgeschrie-  
benen Kanäle ("Tunnel")  
im Träger  
(TISELIUS A., 76)

β) um "Barrieren"  
(MC DONALD)  
(Hannig K., 55)



#### 4c) Zonenelektrophorese im Gel als Träger

Ablenkung vom direkten  
Weg und gleichzeitige  
Filtration.

(BEHRING - Sonder-  
druck, 3 ).

a) Bei der freien Elektrophorese beschreibt das Ion einen direkten Weg zur Elektrode. Die zurückgelegte Strecke  $d$ , ohne Berücksichtigung von Elektro-osmose, beträgt

$$d = U \cdot t \cdot \frac{V}{l}$$

$t$  = Zeit,  $V$  = Spannung,  $U$  = Beweglichkeit des elektrophoretischen Flusses,  $l$  = Länge der Röhre.

b) Bei der Zonenelektrophorese z. B. auf Filterpapier oder Stärke erfährt das Ion eine Ablenkung vom kürzesten Weg zur Elektrode durch die vorgeschriebenen Kanäle zwischen den Barrieren des Trägermaterials. Die zurückgelegte Strecke  $d'$  in der Zeiteinheit beträgt also

$$d' = d \cdot \frac{l'}{l}$$

$l'$  = Länge des Kanals,  $l$  = Länge des Trägers.

c) Erfolgt die Elektrophorese in einem Gel als Trägermedium, so kommt zu der Ablenkung des Ions vom direkten Weg zusätzlich eine Filtration der Ionen, eine Selektivierung nach dem Gesichtspunkt der Molekülgröße und Form der Ionen zustande. SMITHIES O. (146) schreibt: "während sich die Elektrophorese mit Filterpapier oder Stärkegranula in einem gleichmäßigen Film um die Trägersubstanz abspielt, müssen bei Gelsystemen die wandernden Ionen durch die Gelmatrix hindurchdringen" - "So kann eine Substanz, die in der Papier- oder Tiseliuselektrophorese einheitlich wandert, in der Elektrophorese mit Agar-, Stärke- oder Polyacrylamid-Gel mehrere Komponenten aufweisen, sofern in der Untersuchungssubstanz Teilchen enthalten sind die zwar gleiche Ladung besitzen, sich jedoch nach Molekülgröße, Form und Struktur unterscheiden" (3)

Dies zeigt folgendes Beispiel (143):

$\beta$ -Lipoprotein, Transferrin und Hämoglobin mit dem relativen Molekulargewicht von etwa 20, 1,4 und 1,0 weisen bei der Filterpapierelektrophorese annähernd gleiche Beweglichkeit auf. Im Stärkegel hingegen besitzen sie bei demselben pH-Wert wie bei der Filterpapierelektrophorese differente Beweglichkeit, und zwar in der Relation 0,14, 0,88 und 1,0; also bewegen sie sich in der umgekehrten Folge ihrer Größenordnung. Es gilt: (Modell c)

- Moleküle, deren Größe und Form das Lumen der "Maschen" im Netzwerk des Gels übertreffen, können in das Gel nicht eindringen und bleiben an der Startstelle liegen.
- "relativ große und/oder in ihrer Molekülgestalt sehr stark von der Kugelform abweichende Proteine wandern deutlich langsamer, bzw. werden an ihrem Eindringen in das Stärkegel behindert; damit wird auch erklärt, weshalb  $\alpha_2$ -Makroglobulin und  $\beta$ -Lipoprotein in das Stärkegel eintreten, während andererseits das abnorme  $\gamma$ -Makroglobulin im allgemeinen nicht eindringt." (134)
- Kleine Moleküle können dagegen ungehindert auf dem nächsten Weg zur entgegengesetzten Elektrode wandern.
- Dazwischen liegt das breite Spektrum von Molekülen, die während des elektrophoretischen Prozesses sich entsprechend ihrer Größenordnung und Gestalt einen passenden Weg durch die Gelmatrix erst bahnen müssen.

Der sog. "barrier effect" nach BERMES E. W. und Mc DONALD H.J. (6) ist also bei einem Gel als Trägersubstanz besonders deutlich wirksam. Ob im Stärkegel beim Wandern der Untersuchungssubstanz durch das sich wahrscheinlich ständig verändernde Netzwerk der Polysaccharidketten neben dem beschriebenen physikalischen Effekt auch chemische Reaktionen stattfinden und am Trennungsvorgang teilhaben, ist noch ungeklärt.

SMITHIES O. (146) hat die Abhängigkeit der elektrophoretischen Wanderung von der Molekülgröße des wandernden Teilchens einerseits und der Textur des Gels aus Stärke andererseits experimentell demonstriert:

- a) Zunächst zeigt er die Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke von Ionen und der Stärkekonzentration im Gel;  
die Wanderungsstrecke aller Komponenten nimmt (wenn auch nicht linear) mit zunehmender Stärkekonzentration ab, da der Weg der Ionen durch eine dichtere Textur des Trägers erschwert wird.

Die experimentellen Ergebnisse faßt SMITHIES O. zusammen in der Gleichung:

$$m = a + (b/s)$$

$m$  = Wanderungstrecke,  $s$  = Stärkekonzentration,  
 $a$  und  $b$  sind Konstanten.

Die Gleichung läßt sich graphisch darstellen (nach 146) Fig. 5

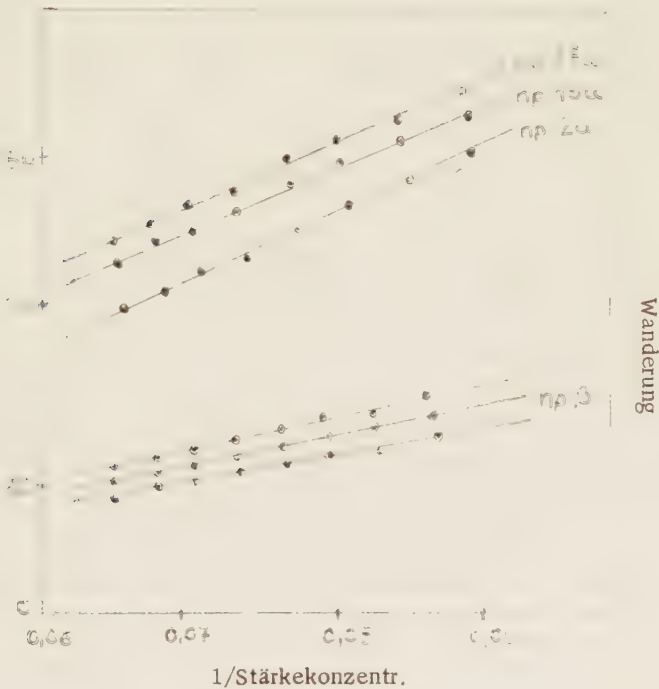


Fig. 5 Wanderungstrecke (in mm) verglichen mit dem  
 reziproken Wert der Stärkekonzentration (in g/100 ml Puffer)

b) Wie weit die Wanderung in Gelen verschiedener Konzentration von der Größe der wandernden Teilchen abhängt, zeigt die nächste Darstellung (nach 146):  
 Fig. 6 (Seite 18)

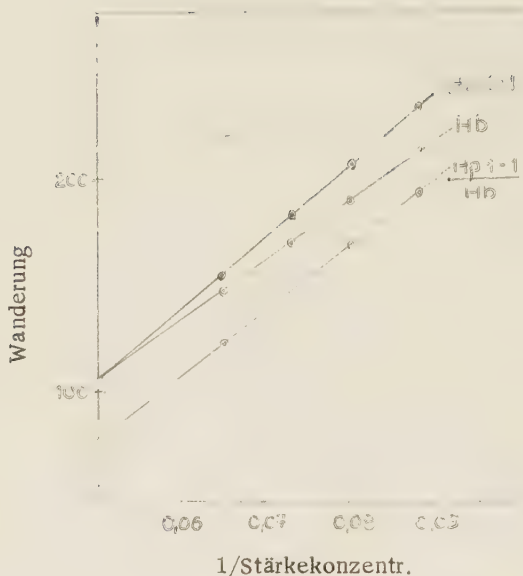


Fig. 6 Haptoglobin 1-1 (Hp 1-1)

Mol.-Gew. = 100,000

Hämoglobin Hb

Mol. -Gew. = 67,000

Haptoglobin 1-1 )

Hämoglobin ) Komplex

Mol. -Gew. = 167,000

Größere Moleküle wandern bei bestimmter Stärkekonzentration langsamer als kleine Moleküle; ihre Retardation ist relativ erhöht gegenüber jener der niedermolekularen Teilchen.

c) Folgende Darstellung (Fig. 7) der relativen Wanderung von Proteinen in Gelen verschiedener Konzentration soll zeigen, daß die Retardation eine Funktion der Größendifferenz und nicht der Ladungsdifferenz ist (Fig. aus 146).



Fig. 7 Durch alle entsprechenden experimentell erhaltenen Punkte wird jeweils eine Linie gezogen; die Gerade durch hp 1 F $\alpha$  ist die Einheit für folgende Überlegung:

- hp 1 F $\alpha$  und hp 1 S $\alpha$  haben in jeder Stärkekonzentration dieselbe relative Beweglichkeit, während sich die Beweglichkeit von hp 2 $\alpha$  mit zunehmender Stärkekonzentration laufend vermindert.
- Es läßt sich daraus schließen, daß hp 1 F $\alpha$  und hp 1 S $\alpha$  bei enger werdender Textur dieselbe Retardation erfahren, in der Molekülgröße also übereinstimmen, und sich lediglich in der Ladung unterscheiden.
- Die Größenordnung von hp 2 $\alpha$  jedoch ist von jener der beiden anderen verschieden und zwar höher gelegen.

SMITHIES O. definiert den Retardationskoeffizienten eines gegebenen Ions folgendermaßen:

$$r = \frac{\Delta m}{m} \cdot \Delta \left( \frac{1}{s} \right)$$

$\Delta m$  = Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit,

$\Delta \frac{1}{s}$  = Änderung der reziproken Stärkekonzentration.

## 5. zur apparativen Anordnung

Zur apparativen Anordnung bei der S. G. E. sei noch erläutert, weshalb die Elektrophorese nicht, wie ursprünglich, in horizontaler Lage der Gelkammer (142), sondern vertikal stattfindet:

- a) um die Wirkung des elektroosmot. Flusses in Richtung Kathode auf den elektrophoretischen Transport zu dämmen;
- b) um dem Effekt der Elektrokantation entgegenzuwirken.

ad a)

BLOEMDAL H. (8) demonstriert experimentell den Einfluß der Elektro-osmose auf die Trennung und dessen Verminderung in Abhängigkeit von der apparativen Anordnung bei einem Versuch der elektrophoretischen Auftrennung von Linsen-Proteinen im Stärkemedium; Fig. 8 (Seite 21).

- $\alpha_1$  Horizontale Anordnung des Stärkeblockes; Elektroden-schalen in gleicher Höhe.  
Nach der Elektrophorese war durch elektroosmotischen Transport zur Kathode in der Kathodenschale der Flüssigkeitsspiegel gestiegen.  
- Nur 1 Komponente ist zu sehen.
- $\alpha_2$  Horizontale Anordnung des Stärkeblockes; Erhöhung der Kathodenschale um 20 cm;  
- Die Auftrennung ist verbessert.
- $\alpha_3$  Vertikale Anordnung des Stärkeblockes; Höhenunterschied der Elektroden-schalen = 20 cm;  
- die Auftrennung ist vollständig.

ad b)

Bei der horizontalen Anordnung des Gelblockes (142) beobachtete SMITHIES O. (144) sehr ausgeprägt den Effekt einer Elektrodenkantation:

In einem senkrechten Depotspalt im horizontal angeordneten Gel wurde Serum, mit Hämoglobin als Indikator, eingefüllt. Bei Stromanschluß richtete sich das Hämoglobin mit der Mehrzahl der Serumproteine zur anodischen Gelfläche des Depotspaltes aus, die  $\beta$ -Globuline zur kathodischen Seite. Die

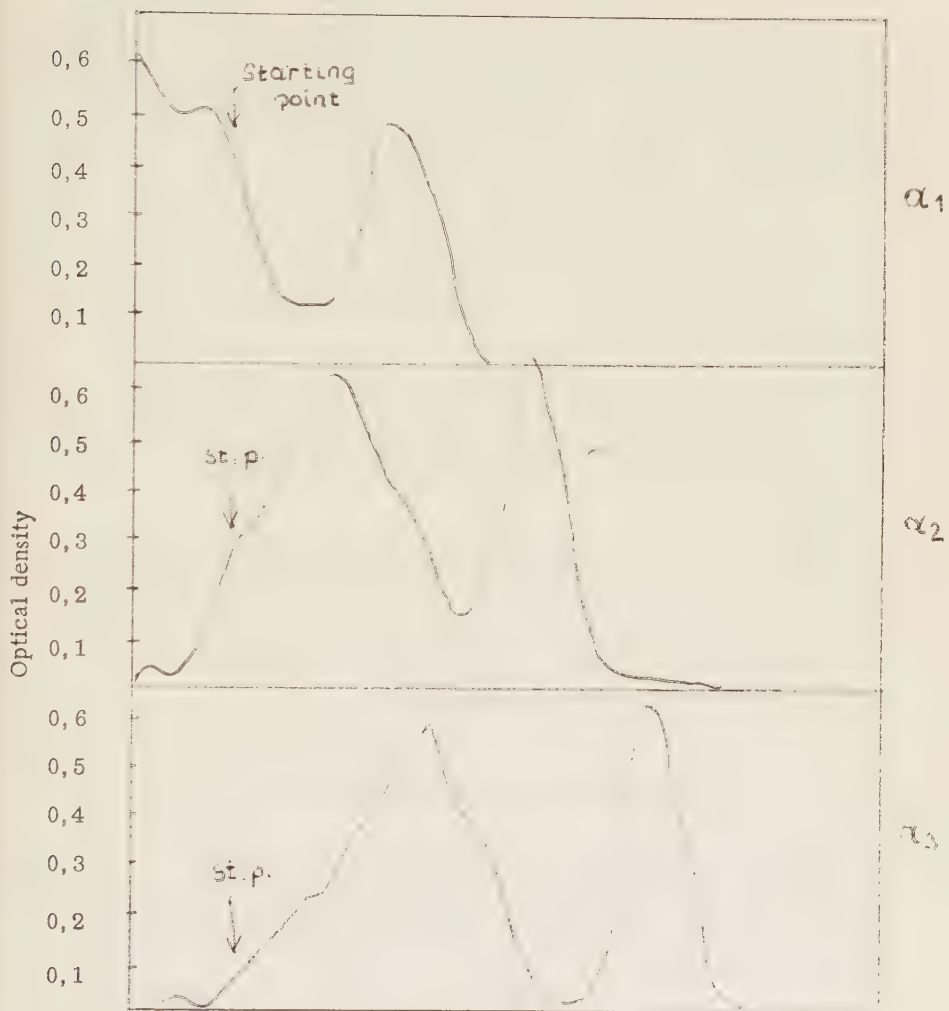


Fig. 8

homogene Dichte der Proteinlösung war derart aufgehoben, daß sich der höher konzentrierte anodisch wandernde Proteinanteil gemäß der Schwerkraft am Boden des Gels verteilte, die  $\gamma$ -Globuline dagegen in die oberen Schichten des Gels eindringen.

Dies wurde beim Anfärben der Proteinkomponenten nach Abschluß der Elektrophorese deutlich.

SMITHIES O. (144) schreibt, daß dieser Effekt der Dekantation wesentlich vermindert sei, wenn das Serum mit Trägersubstanz, z. B. Filterpapier oder Stärkegranula, in das Gel eingebracht wird; daß aber die Deutlichkeit der Auftrennung darunter leide.

Deshalb schlägt SMITHIES O. (144) die Elektrophorese in senkrechter Anordnung der Gelkammer vor; der Depotspalt ist jetzt in der Horizontalen. Der anodisch sowie kathodisch wandernde Anteil der Serumproteine kann gleichmäßig verteilt in die gesamte Breite des Gelblockes anodisch bzw. kathodisch einwandern.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das Verfahren der Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES O. (142, 144) zur Analyse von Serumproteinen der Möglichkeit der Selektivierung einzelner Komponenten nach dem Gesichtspunkt der spezifischen Nettoladung und zugleich der spezifischen Molekülgröße und Form momentan optimal gerecht wird.

## B. Theoretische Grundlagen der Subfraktionierung der Proteine

In dieser Arbeit soll das Verhalten von dissoziierten, reduzierten und alkylierten  $\gamma$ -Globulinen bei der Stärkegelelektrophorese dargestellt werden.

Zunächst seien die theoretischen Grundlagen von Dissoziation, Reduktion sowie der Alkylierung von Proteinen kurz erläutert.

Proteine sind eine Aneinanderreihung von Aminosäuren in spezifischer Sequenz mittels Peptid-Bindungen zu Peptidketten, in der sog. Primärstruktur. Diese Peptidketten sind intermolekular bzw. intramolekular zu einer spezifisch definierten Sekundärstruktur geordnet; entsprechend dem Modell von PAULING zu der sog. Faltblattstruktur (pleated sheet) bzw. der  $\alpha$ -Helix. PAULING und COREY stellen für die Konstruktion der beiden Modelle bestimmte Bedingungen; neben der L-Konfiguration der Aminosäuren, den Bindungswinkeln und Bindungsabständen der Ebene der Peptidbindungen bestimmen Wechselwirkungen zwischen Atomkonfigurationen der Peptidbausteine, insbe-

die intra- bzw. intermolekularen Wasserstoffbindungen zwischen einem Sauerstoffatom einer C=O-Gruppe und einem Wasserstoffatom einer NH-Gruppe, die Sekundärstruktur der Peptidketten.

Jene Wasserstoffbindungen sind maßgeblich an der Stabilisierung der sog. Tertiärstruktur, d.h. der Anordnung der Peptidketten und Helix-Abschnitte in dem zur Verfügung stehenden Raum, beteiligt.

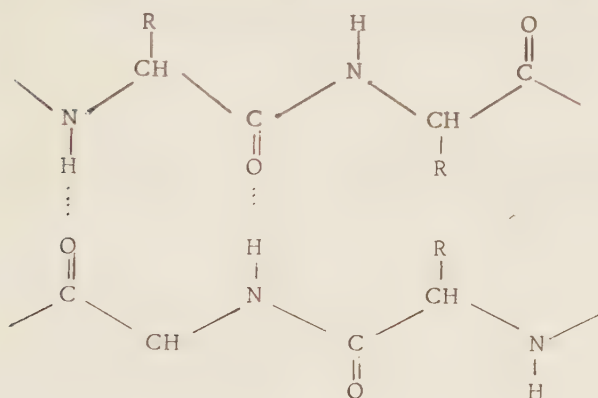


Fig. 9 Wasserstoffbindungen zwischen 2 Peptidketten

#### 1. Dissoziierung der Wasserstoffbindungen mit Harnstoff

Durch Einwirkung von Harnstoff auf Proteine werden die Wasserstoffbindungen gesprengt und die Sekundär- und Tertiärstruktur soweit sie durch diese bedingt waren, weitgehend zerstört. Das Protein entfaltet sich. Durch diesen Eingriff ist es denaturiert.

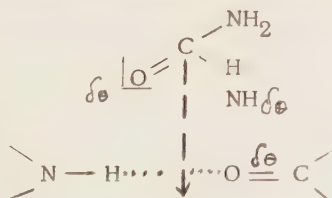


Fig. 10 Wirkung von Harnstoff auf die C=O...HN-Bindung

Von methodischer Bedeutung ist, daß nach anschließend erfolgter Reduzierung und Alkylierung der Proteine die Proteinuntereinheiten in Lösung bleiben, wenn Harnstoff enthalten ist.

In wässriger Lösung nämlich, außer bei extremen pH-Werten, ist das reduzierte und alkylierte  $\gamma$ -Globulin unlöslich. EDELMANN G. M. (23) zeigt dies anhand von Untersuchungsergebnissen mit der Ultrazentrifuge.

Um die Dissoziation der Proteine auch während der Elektrophorese im Gel aufrechtzuerhalten, enthalten das Gel und die Wannepuffer ebenso Harnstoff.

## 2. Reduktion des Proteins

In dieser aufgeschlossenen Konfiguration des Proteinmoleküls ist der Zugang der reduzierenden Substanz zu den innermolekularen Disulfidbrücken begünstigt.

Zahlreiche Verfahren zur Analyse von Proteinen mittels Reduzierung wurden erprobt. Es seien die Wichtigsten aufgeführt:

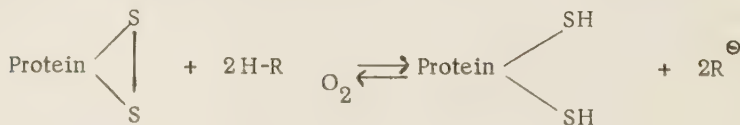
HOPKINS F. G. (60) fand, daß in neutraler bis leicht alkalischer Lösung durch Zugabe von SH-Verbindungen verschiedener Art, wie Glutathion, Cystein oder Thioglycolsäure, eine Reduktion von S-S-Gruppen im Protein erfolgt.

WALKER E. (158) stellte erstmals die Reduktion von Disulfidbrücken einiger Proteine mit alkylierten Cyaniden dar.

ALLEN R. S. und MURLIN J. R. (1) berichteten von einer Reduktion durch katalytische Hydrogenisierung.

Auch Reduktionsverfahren mit Ascorbinsäure (30),  $\text{SO}_2$  (87) und  $\text{SO}_3$  (46) werden schon früh beschrieben.

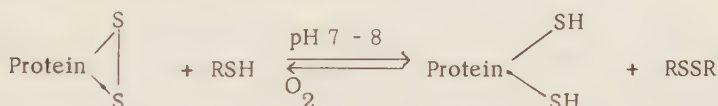
Alle Substanzen haben denselben Effekt: die Disulfidbrücken des Proteinmoleküls werden gespalten.



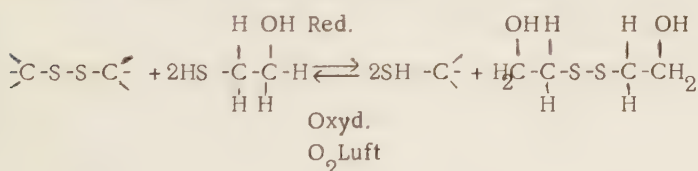
Bei der Anwendung von SH-Verbindungen ist je nach Untersuchungsmaterial das Präparat zu wählen, da die einzelnen SH-Verbindungen in ihrem Wirkungsgrad differieren (42).

Bei der Untersuchung von  $\gamma$ -Globulinen, die in der vorliegenden Arbeit besonders interessieren, wird in der Literatur meistens von Merkaptanen, und zwar überwiegend von Cystein oder Merkaptoaethanol (Lit. siehe später) berichtet. In dieser Arbeit wurde  $\beta$ -Merkaptoaethanol verwendet.

Einwirkung eines Merkaptan-Präparates:



Einwirkung von  $\beta$  - Merkaptoaethanol:



### 3. Alkylierung mit $\alpha$ -Halogen - Fettsäuren

Der reduzierte Zustand der Proteinuntereinheiten ist sehr labil. Bei Zutritt von Luftsauerstoff aggregieren diese wieder zu höhermolekularen Einheiten, welche jedoch nicht mehr mit denen im Nativzustand des Proteins identisch sein müssen.

Durch Carboxy-Alkylierung der SH-Gruppen mit  $\alpha$  -Halogen-Fettsäuren kann dieser Prozeß verhindert werden.

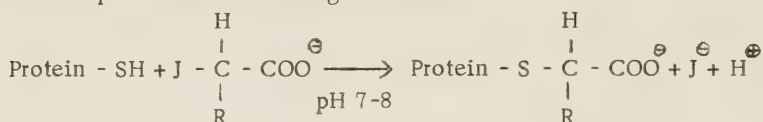
RAPKINE L. (120) fand, daß SH-Gruppen von Proteinen mit Jod-acetat in neutraler oder leicht alkalischer Lösung reagieren, ähnlich wie DICKENS F. zuvor (27) über reduziertes Glutathion berichtet hatte.

Von den in der Literatur angeführten Alkylierungsmitteln Jodacetamid, Jodäthylalkohol,  $\alpha$  -Brom-Fettsäuren, Benzyl- und Phenylaethyl-Halogenverbindungen) wird heute fast ausschließlich Jodacetamid angewendet. Dieses

besitzt einen etwas höheren Wirkungsgrad als Jodacetat (149).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Alkylierung mit Jodacetamid.

Das Prinzip der Reaktion ist folgendermaßen:



Das Ergebnis der Reaktion von  $\gamma$ -Globulinen mit Harnstoff,  $\beta$ -Merkapto-  
aethanol und Jodacetamid sind Proteinspaltprodukte. Diese werden anschlie-  
ßend mit der Methode der Stärkegelelektrophorese dargestellt; dabei sind  
sie dem Prinzip der Auswahl nach elektrischer Ladung und Molekülgröße unter-  
worfen.

Die elektrophoretische Auftrennung eines Proteins in den verschiedenen  
Stufen der Aufarbeitung zeigt vergleichsweise Versuch (Abb. 33 Fig. 26)  
anhand des normalen  $\gamma$ -Globulins.

### III. A Methode der Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES O. (143, 142, 144, 141), in eigener Abänderung

#### 1. Material zur Ausführung der einfachen S. G. E.

##### Stärke:

Starch Hydrolysed for Gel electrophoresis  
Connaught Medical research Laboratories.  
University of Toronto: Toronto, Canada.

Auch einige Versuche mit SERVA-Stärke (nach SMITHIES O. zubereitet) wurden vorgenommen; jedoch waren bei demselben Mengenverhältnis Stärke/ Puffer zur Herstellung des Gels und bei ansonsten denselben Versuchsbedingungen die Banden der Auftrennung mit CONNAUGHT-Stärke schärfer begrenzt als mit SERVA-Stärke.

##### Puffer:

Borat-Puffer nach SMITHIES O. , pH 9,0 - 9,1  
0,025 mol  $H_3BO_3$   
0,01 mol NaOH

Diesen Boratpuffer sowohl zur Herstellung des Gels, als auch als Wannenpuffer verwenden.

gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung

gesättigte Kaliumchlorid-Lösung

Jede dieser beiden gesättigten Lösungen ist für die Elektrodenschalen-Lösung mit aqua bidest. im Verhältnis gesätt. Lösung / aqua bidest. = 2 : 1 zu verdünnen.

##### Paraffin:

Erstarrungspunkt etwa  $46 - 48^{\circ}C$  (E. MERCK A. G. ).

Mit Paraffinum liquidum auf einen Erstarrungspunkt von etwa  $43 - 45^{\circ}C$  bringen.

##### Amidoschwarz 10 B:

Zum Färben der elektrophoretisch erhaltenen Proteinbanden im Gel  
Die Farbstofflösung ist folgendermaßen: 5 g Amidoschwarz 10 B auf 1 Liter Eisessig - Methanol (1 : 9).

##### Eisessig - Methanol - Aqua dest.:

Zur Herstellung der Fixierlösung bzw. der Entfärbelösung im Volumenver-

hältnis 10 : 50 : 50 mischen.

Esso-Universalöl:

Zum Einfetten der Kammer.

## 2. Geräte

Kammer (SMITHIES, O., 12)

Kammer 1 (35 x 12 cm)

Kammer 2 (30 x 12 cm)

Verschlußdeckel mit Kamin

Verschlußkufen

2 Saugflaschen: 1000 ml und 250 ml

1 20 ml-Meßpipette mit abgebrochenem Auslauf zum Pipettieren von Gel.

2 Elektrodenschalen (20 x 10 x 10 cm) mit Platinelektroden

2 Glaswannen als Pufferschalen (20 x 10 x 10 cm)

Schneidebogen und Schneidebrett

1 Glaswanne für das Färbebad (40 x 20 x 20 cm)

2 Glaswannen zum Entfärben bzw. Fixieren (40 x 20 x 20 cm)

Drahtgitter (nichtrostend) für den Färbe- und Entfärbevorgang (35 x 16 cm)

Spannungsstabiles Gleichstromnetzgerät

(Volt-Bereich bis 300 V

Milliampere-Bereich bis 120 mA)

Voltmeter

Ständer für Kammer und Elektrophoreseschalen

2 Ventilatoren

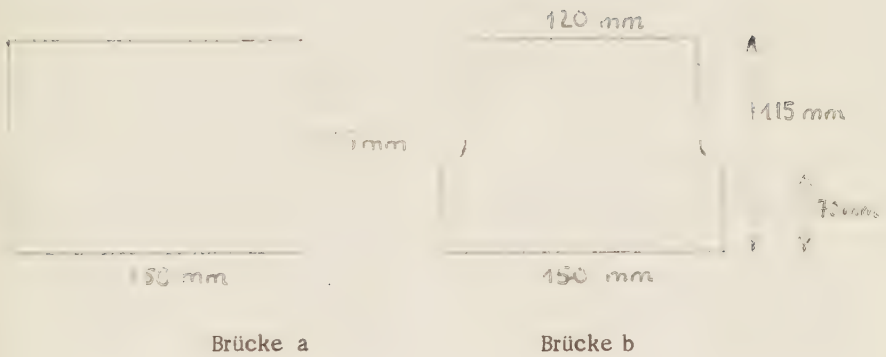
BINZER-Filterpapier (59 x 58 cm), Nummer 374,

für Filterpapierbrücken a - b - c

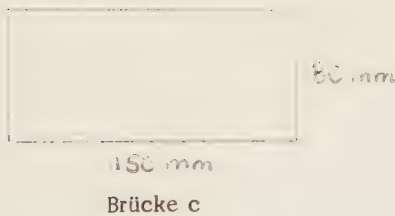
Fig. 11

Maße der Filterpapier-Brücken:

aus je 1 Bogen Filterpapier falten:



aus 2 aufeinander gelegten Bogen Filterpapier falten:



### 3. Untersuchungsmaterial

Vollserum:

Bei anomal hohem Prozentsatz an Gesamteiweiß, insbesondere bei Paraproteinämien, ist es ratsam, vergleichsweise das Serum in unverdünntem Zustand und in verschiedenen Verdünnungsgraden (mit dem Boratpuffer des Gels verdünnen)

elektrophoretisch zu untersuchen.

#### isolierte Serumeiweißfraktion:

Bei der Aufarbeitung hat sich am besten eine Lösung mit einem Eiweißgehalt von 0,7 - 1,0 g% bewährt.

Die Versuchsergebnisse sind verbessert, wenn die Serumeiweißfraktion gegen den Boratpuffer des Gels dialysiert wird.

#### 4. Arbeitsgang bei der Stärkegelelektrophorese

##### Vorbereitung der Gel-Kammer:

Der Hauptteil der Kammer wird mit den beiden Querwänden zu einem Trog fest verschraubt und die Innenseite dieses Troges und des Kammerdeckels, besonders sorgfältig die Matrize des Deckels, mit einem nur dünnen Film ESSO-Universalöl überzogen (ähnlich 80, 142, 101). Damit werden Kriechstromelemente entlang der Kammer vermieden (101). Zugleich verhindert man einerseits beim Auflegen des Deckels auf den mit flüssigem Gel gefüllten Trog, daß sich an der Matrize Luftbläschen und im Gel Aussparungen bilden, da das noch flüssige Gel leicht auf dem Öl-Film entlanggleitet; andererseits ist ein Ankleben unmöglich und läßt sich nach Beendigung der Elektrophorese der Stärkegelblock leicht, d. h. ohne zu brechen, aus dem Trog auf das Schneidebrett schieben.

Trog und Deckel werden anschließend bis zum Gebrauch im Brutschrank bei 36 °C vorgewärmt.

##### Herstellung des Gels:

Das Stärkegel wird angefertigt aus 13 g CONNAUGHT-Stärke pro 100 ml Boratpuffer (130, 3). Für Trog 1 ist die sechsfache Menge, für Trog 2 die fünffache Menge ausreichend.

Stärkegele mit anderer Stärkekonzentration (142, 80, 10, 34), führten bei den in dieser Arbeit gegebenen Versuchsbedingungen zu ungenügenden Ergebnissen. Wenn auch die CONNAUGHT-Stärke hydrolysiert ist, so ist es dennoch ratsam, jeweils kurz vor Anfertigung des Gels die benötigte Menge Stärke mit einem feinen Sieb wiederholt durchzuseihen; man erhält stets einen beträchtlichen Rückstand, den man möglicherweise verwerte; diese Stärkekörnchen lösen sich nämlich beim Kochen nur selten auf und, wenn sie sich im Gelblock befinden, stören als Zentren erhöhten Widerstandes die Gleichmäßigkeit im elektrischen Feld und hemmen bzw. verlangsamen das Vorwandern der Proteine an ihrer

## Lokalisation.

Stärke und entsprechende Puffermenge werden in einer 1000 ml - Saugflasche gründlich gemischt und im Wasserbad unter stetem Umrühren erhitzt. Die Suspension nimmt nach 5 - 7 Min., wenn die Temperatur im Kolben den sog. "Gel-Punkt" (143) erreicht hat, in ihrer Viskosität plötzlich stark zu; diese fällt nach einem Maximum rasch ab. Das Gel wird wieder dünnflüssig.

Die Viskositätsveränderungen während der Zubereitung eines Boratpuffer-Stärkegels stellt ein "Brabander Amylograph" beispielsweise graphisch dar: (Fig. 12):

Die Zusammensetzung dieses Gels - 13 g Stärke/100 ml Puffer 0,023 mol  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,0092 mol NaOH - stimmt annähernd mit jener des in dieser Arbeit verwendeten Gels überein.

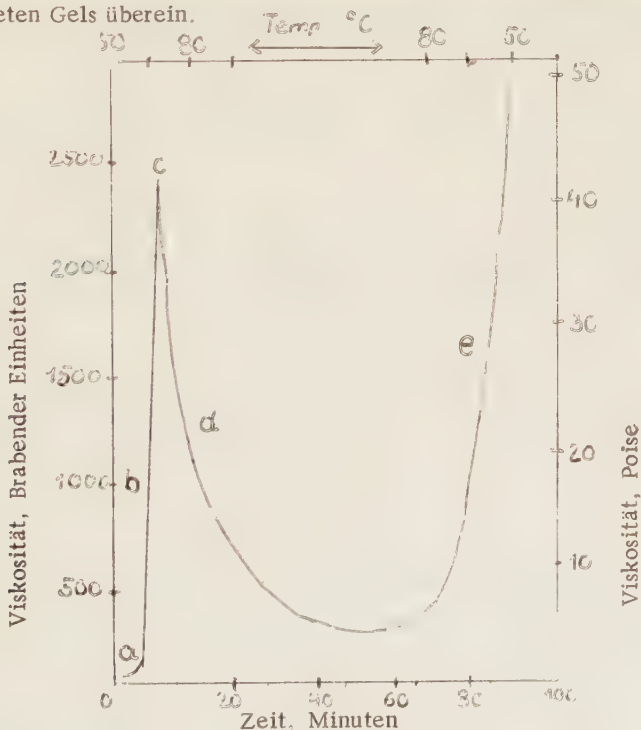


Fig. 12 (Abbildung aus SMITHIES O. (143), Dr. J. H. PERT)

Legende zur Abb. 12 siehe Seite 32.

### Legende zur Fig. 12:

- a. niedrige Ausgangsviskosität
- b. plötzlicher Anstieg der Viskosität bis zum sog. "Gel-Punkt" ( $65^{\circ}\text{C}$ )
- c. Viskositätsmaximum während des Erhitzens
- d. Viskositätsabfall bei weiterem Erhitzen
- e. erheblicher Viskositätsanstieg beim Abkühlen

Es ist wichtig, darauf zu achten, daß man das Gel, nachdem die maximal hohe Viskosität erreicht war, noch genügend lang, ca. 9 Min., rührt, ehe man das Erhitzen beendet.

Die Saugflasche wird mitsamt dem Wasserbad von der Flamme genommen und das Gel noch weiterhin etwas gerührt, um eine einheitliche Temperatur im flüssigen Gel sicherzustellen.

Die zahlreichen kleinen Luftblasen im Gel entfernt man durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe.

### Gießen des Gels:

In den schon vorbereiteten Trog wird das heiße Gel eingegossen, so daß es leicht über den Trogrand läuft und in der Mitte des Troges Gel etwas im Überschuß ist. - Etwaige Stärkeknoten müssen jetzt noch aus dem Gel entfernt werden.

Dann klappt man, wie ein Deckglas auf einen Objektträger, von einer Längsseite des Troges aus den Deckel langsam und gleichmäßig auf den Trog, und zwar derart, daß die Matrize für die Auftragestelle 12 cm von einer Schmalseite entfernt - diese wird später zur Kathode - in das Gel dringt. Sofort mit den Verschlußkufen den Deckel fest auf den Trog pressen !

Das überschüssige Gel kann durch den Kamin entweichen; meist ist es notwendig, beim Zuschrauben noch Gel in den Kamin nachzugießen. Es ist zweckmäßig, daß sich darin noch Gel als Reserve befindet, da beim Erkalten das Volumen des Gels sich etwas vermindert.

Etwa 20 Min. lang kühle der gefüllte Trog bei Labortemperatur etwas ab, bevor man ihn in den Eisschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  gibt. Nach 3 Stunden bei Eisschranktemperatur oder 6 Stunden Raumtemperatur ist das Gel für den weiteren Arbeitsgang brauchbar.

### Einbringung der zu untersuchenden Materials:

Vor dem Abheben des Deckels vom Trog entfernt man mit dem Schneidebogen den Gel-Zylinder im Kamin des Deckels, um ein Einreißen des Gels zu verhindern, Kondenswasser und Ölschicht müssen mit Filterpapier von der Geloberfläche abgesaugt, etwaige Vakuolen im Gel ausgebessert und Luftblasen zwischen Gelblock und Geltrog ausgedrückt werden.

Nun ist der Gelblock bereit zur Einbringung des zu untersuchenden Materials.

Das Untersuchungsmaterial, sei es Vollserum oder eine Serumeiweißfraktion, wird nicht als solches in das Depot gefüllt, sondern mit Gel zuvor vermischt,

Dazu fertigt man in einer 250 ml - Saugflasche aus 5 m CONNAUGHT - Stärke und 50 ml des Boratpuffers ein Gel an und vermischt davon jeweils 0,25 ml lauwarmes Gel mit 0,25 ml der zu untersuchenden Proteinlösung in einem kleinen Meßbecher.

Dieses Gemisch wird ohne Luftbläschen in das Depot bis zum Niveau der Geloberfläche gefüllt.

Dann muß der Gelblock um die Auftragstelle sorgfältig gereinigt werden. Es ist ratsam, vor Einfüllen des Gelgemisches entlang dem Depotgraben angefeuchtete Filterpapierstreifen auf das Gel zu legen, um eine Verunreinigung der Geloberfläche zu vermeiden. Die Streifen lassen sich anschließend leicht entfernen.

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der Einbringung des Untersuchungsmaterials angegeben, welche für die Qualität der elektrophoretischen Auftrennung von großer Bedeutung sind.

### Einfügen eines getränkten Filterpapierstreifens :

SMITHIES O. (142) beschreibt erstmals die Möglichkeit, mit Serum getränktes Filterpapier in einen Spalt senkrecht zur Längsachse des Gelblockes zu schieben (ebenso Lit. 80, 10, 108, 86, 124). Das Filterpapier muß im Überschuß mit Serum getränkt sein und ohne Luftblasenbildung direkt am Gel anliegen.

Wegen des bedeutenden Adsorptionseffektes am Filterpapier, der sich auch nach verschiedenartiger Vorbehandlung des Papiers kaum beseitigen läßt, ist diese Methode für einige Untersuchungen (143) ungünstig.

Die angeführte Methode nach SMITHIES O. wurde später die Grundlage für die 2-dimensionale Stärkegel-Elektrophorese (147, 111, 110, 117, 148, 136): nachdem die zu untersuchende Substanz papierelektrophoretisch getrennt worden

ist, fügt man den Streifen wie oben beschrieben in den Stärkegelblock ein. Die Wanderungsrichtung bei der Elektrophorese im Stärkegel ist dann senkrecht zu jener vorausgehenden auf dem Papierstreifen. Die Auftrennung ist also zweidimensional.

An dieser Stelle seien kurz zwei weitere Verfahren der zweidimensionalen S. G. E. erwähnt, bei denen die primäre Auftrennung entweder im Agargel (2) oder im Stärkegel (23) erfolgt.

#### Einfüllung in ein ausgespartes Depot:

SMITHIES O. (142) und mehrere Autoren (10, 33, 104) geben die Zubereitung einer Paste aus Untersuchungsmaterial und Stärkegranula an. Hierbei ist nur ein geringer Adsorptionseffekt zu bemerken (78),

In der vorliegenden Arbeit konnten damit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten werden; denn es ist schwierig, ein günstiges Mengenverhältnis von Stärke und Untersuchungsmaterial zu bestimmen. Im allgemeinen wird heute diese Art der Einbringung nicht mehr angewandt.

In der einschlägigen Literatur ist meistens die Einfüllung des Untersuchungsmaterials selbst (142, 143, 130, 10) angegeben.

Diese Methode zeige den "besten Trenneffekt, da keinerlei Trägermaterial angewendet wird, welches das Eindringen der zu untersuchenden Substanz in das Gel beeinflussen würde" (143).

FINE J. M. et al. (34) schlägt vor, aus 1,5 g "MERCK-Stärke" und 5 ml Borat-Puffer ein Gel herzustellen, dieses auf 40 °C abzukühlen, mit Serum im Verhältnis 1 : 1 zu vermischen und dieses Serum - Gel - Gemisch in das Depot zu füllen.

#### Paraffinüberzug:

Es ist zweckmäßig, einige Minuten zu warten, bis das Serum - Gel - Gemisch im Depot erkaltet ist. Dann übergieße man die Oberfläche des Gelblockes, und zwar zuerst an der Auftragestelle von der Seite her, vorsichtig mit 43 - 45 °C temperierten Paraffin (130), bis zu einer Schichtdicke von etwa 3 - 4 mm. Die beiden Längsseiten des Troges werden nachträglich noch gesondert mit einer Paraffinborde verstärkt.

Mit dem Paraffinüberzug bezweckt man eine Stütze des Gelblockes bei senkrechter Stellung und verhindert gleichzeitig ein Verdunsten bei der Wärmeentwicklung während der Elektrophorese.

Im noch weichen Zustand das Paraffin am anodischen und kathodischen Ende des Troges zurechtschneiden;

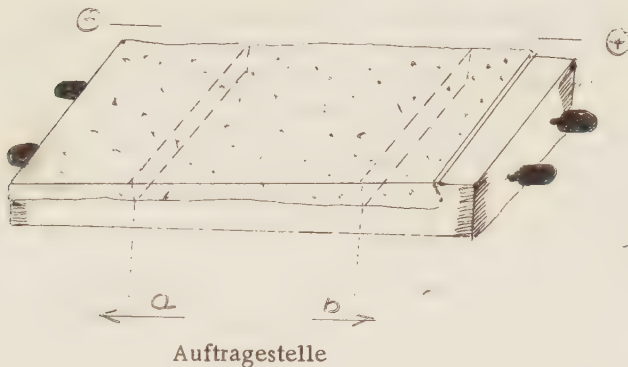


Fig. 13

am kathodischen Ende schneidet die Paraffinschicht genau mit dem Gelblock ab; am anodischen Ende dagegen soll die Paraffinschicht etwa 2 cm vor dem Ende des Gelblockes zugeschnitten werden.

Anschließend den Trog mit Stärkegel, übergossen mit Paraffin, etwa 20 Min. kalt stellen. Das Paraffin kann dabei erhärten und die Proteinlösung auf Grund des Dochteffektes den Kontakt zum Gelblock aufnehmen.

SMITHIES O. (144) überzieht den Gelblock mit einer Schicht "petroleum jelly", FAHEY J. L. (31) und POULIK M. D. (116) mit einem "Sarah film".

#### Vor der Elektrophorese:

Die Trogwände an den beiden Schmalseiten werden entfernt, der Trog am Ständer befestigt und vorsichtshalber an den beiden Trogenden das Paraffin mit Gummiringen festgehalten; zwischen Paraffin und Gummiringe klemme man ein Stück Kartonpapier.

Vor jeder Elektrophorese müssen Wannepuffer und Elektrodenschalen - Lösung erneuert und die Elektroden selbst umgepolt werden.

Die Filterpapierbrücken mit Boratpuffer gut anfeuchten ! Es ist ratsam, die

Wannen und die verbindenden Brücken gegen Verdunstung abzudecken.

Es sei hervorgehoben, daß, abweichend von der Originalmethode der Stärkegel - Elektrophorese nach SMITHIES O. als Elektrodenschalen-Lösung anstelle von konzentrierter NaCl-Lösung hoch konzentrierte KCl-Lösung (an der Kathode) und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (an der Anode) zur Erzeugung einer hohen Leitfähigkeit verwendet wurde.

Nach der Methode von SMITHIES O. werden die Pufferwannen an beiden Gelenken mit Boratpuffer gefüllt, dessen Molarität höher ist als jene des Puffers im Gel, im pH-Wert jedoch gleich ist. In der vorliegenden Arbeit war der verwendete Wannenpuffer mit dem Puffer des Gels identisch; dadurch ist in den Pufferwannen der Spannungsabfall zwar relativ erhöht, die Wärmeentwicklung aber, die, wie später erörtert wird, ein großes Problem darstellt, relativ vermindert.

In der Literatur sind grundsätzlich zweierlei Puffersysteme angegeben:

- das kontinuierliche Puffersystem, nach SMITHIES O. (142, 144),
- das diskontinuierliche Puffersystem, nach POULIK M. D. (109).

Es sind Puffer verschiedener Zusammensetzung mit pH-Werten von 2 - 11, je nach Fragestellung. Für Untersuchungen von Serumeiweiß kommt nur ein pH-Wert von 8,5 - 9,0 in Frage.

Beiden Systemen ist gemeinsam, daß der Wannenpuffer eine höhere Molarität besitzt als der Puffer im Gel, aber beide im pH-Wert jeweils übereinstimmen.

#### Elektrophorese:

Die Versuchsanordnung hierzu siehe in Fig. 14 !

Die elektrophoretischen Bedingungen unterscheiden sich je nach Fragestellung.

a) Wenn das Gesamtbild der Proteinauftrennung einschließlich Präalbumine gewünscht ist, sind nötig:

Eisschranktemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$

Zeitdauer von 14 Stunden

Spannung von 5 V/cm im Gel

- das heißt, die Spannung in der kontrollierten Meßstrecke beträgt;

bei Kammer 1, 135 Volt/27 cm

bei Kammer 2, 110 Volt/22 cm

Die größere Kammer 1 ist hier vorzuziehen.

b) Wenn man eine Dehnung der Gesamtlänge der elektrophoretischen Auftrennung erreichen will, gilt:

Eisschranktemperatur von 4 °C

Zeitdauer von 15 Stunden

Spannungsabfall von 5,5 V/cm im Gel

- die Spannung in der kontrollierten Meßstrecke beträgt dabei:

bei Kammer 1, 150 - 152 Volt/27 cm

bei Kammer 2, 121 - 123 Volt/22 cm

Die Angaben über die angelegte Feldstärke variieren in der einschlägigen Literatur zwischen 4,5 V/cm bei Raumtemperatur und 15-25 V/cm bei intensiver Kühlung und Verkürzung der Laufzeit.

Die von SMITHIES O. (142, 144) angegebenen Standardbedingungen sind 5 V/cm, 16 - 20 Std., bei zirkulierender Kaltluft.

Kurz ein Überblick über die Varianten:

|             |              |                |                |
|-------------|--------------|----------------|----------------|
| 4,5 V/cm    | 16 Std.      | 10 - 15 °C     | (104, 33, 113) |
| 6 V/cm      | 8 Std.       |                | (101)          |
|             | 14 - 18 Std. |                | (130)          |
| 10 V/cm     | 60 - 90 Std. |                | ( 86)          |
| 15 -22 V/cm | 2 - 3 Std.   | -10 bis -15 °C | ( 80, 75)      |
| 25 V/cm     | 2 Std.       | 0 °C           | ( 83)          |

Ein großes Problem bedeutet die Entwicklung der Joule'schen Wärme im Gel während der Elektrophorese, und damit die Kühlung des Gels. Als Folge stören ein inhomogenes elektrisches Feld durch Stromstärke - und Widerstandsänderungen und Diffusionsprozesse (143, 4, 142) die Präzision der elektrophoretischen Auftrennung. Es entstehen unscharf begrenzte, gekrümmte und innerhalb der Gel-dicke in den einzelnen Ebenen zueinander verzerrte Linien (164).

Mit der Wahl eines Gelpuffers von niedrigerer Ionenstärke ist die Wärmeentwicklung merklich reduziert; allerdings zeigen dann die Versuchsergebnisse störende Effekte wie "Schleppenbildung" der Albuminzone und zusammenge-drängte Zonen (143, 128).

SMITHIES O. (142, 143) schreibt, daß bei der üblichen Schichtdicke der Gel-platte von 0,6 cm und den von ihm vorgeschriebenen Versuchsbedingungen ein Spannungsabfall von höchstens nur 4,5 V/cm zulässig sei, damit die Temperatur im Gel nicht 15 °C überschreitet.

Um ein bestimmtes Maß der Trennung zu erreichen, müßte man also auf

Kosten des Spannungsgefälles die Elektrophoresedauer verlängern. - Der Diffusionsprozeß wäre dadurch wiederum gefördert.

Für die Schärfe der Trennung ist es selbstverständlich vorteilhafter, den Spannungsgradienten hoch zu halten. Es bleibt somit keine andere Wahl, als zu sorgen, daß eine ausreichende Wärmeableitung gewährleistet wird.

SMITHIES O. (142) schlägt ursprünglich vor, den Boden des Troges mit einer Kupferplatte zu bedecken und Kaltluft frei zirkulieren zu lassen. Zahlreiche Geräte wurden inzwischen konstruiert, neuerdings eines von LORBER A. (83), welches eine Spannung von 25 V/cm bei 0 °C Außentemperatur gestattet.

In der vorliegenden Arbeit genügte es, die Elektrophorese im Eisschrank bei 4 °C und zirkulierender Kaltluft mittels 2 Ventilatoren auszuführen.

#### Schneiden des Gelblockes:

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Paraffin vorsichtig entfernt, die Geloberfläche mit Filterpapier abgesaugt, am kathodischen sowie anodischen Ende des Gelblockes der "Gelkeil" (= 2,5 cm) abgeschnitten und der Gelblock auf das angefeuchtete Schneidebrett geschoben.

Man beschwert dann die Geloberfläche mit einer Glasplatte, um beim anschließenden Schneiden mit dem Schneidebogen das Gel in einer möglichst gleichmäßigen Ebene der Länge nach halbieren zu können.

#### Fixieren:

Für etwaige immunoelektrophoretische Untersuchungen (111, 117, 128) oder präparative Zwecke (143, 64, 48, 82, 99, 93, 11) wird zur Identifizierung und Lokalisation der Proteinkomponenten nur eine Hälfte des Gels fixiert und gefärbt.

Im schon geschnittenen Zustand legt man nun mit dem Drahtgitter das Gel zur Fixierung 15 Min. in das Fixierbad.

Das Gel verliert an Transparenz und erhält eine derbere Konsistenz; somit läßt es sich bei dem weiteren Vorgang leichter handhaben.

Ähnliche Angaben sind zu finden bei SMITHIES O. (143), FINE J. M. et al. (33), und BLOEMDAL H. (10).

#### Färben:

6 Min. lang wird anschließend jeweils 1 Gelhälfte in einer Amidoschwarz 10 B - Lösung (52) gefärbt.

Die in der Literatur zum Färben angegebenen Zeiten variieren von 1/2 - 8 Min.

Spezielle Färbungen siehe SMITHIES O. (143) und BEHRING - Druck (3).

#### Entfärben:

In wiederholt erneuertem Entfärbebad werden innerhalb von 24 Stunden die proteinfreien Abschnitte im Gel entfärbt.

#### Aufbewahrung:

Im Entfärbebad können die Gelflächen 2 - 3 Tage aufbewahrt werden, ohne an Schärfe der Trennlinien zu verlieren; dann aber verblassen diese.

### III. B Methode der Harnstoff - Stärkegel - Elektrophorese

zur Darstellung von reduzierten und alkylierten  $\gamma$ -Globulinen; mit Angaben von POULIK M. D. (123, 23) in Abänderung.

#### 1. Material

Dieselben Materialien wie bei der einfachen S. G. E. sind:

Stärke

Elektrodenschalen-Lösung

Paraffin

Fixierlösung

Färbelösung

Entfärbelösung

Esso-Universalöl

Außerdem werden gebraucht:

Puffer "A" für die Proteinlösung:

0,1 mol Boratpuffer pH 8,5;

Puffer "B" zur Herstellung des Gels: Formiatpuffer mit

Formiatpuffer mit Harnstoff -

0,05 M Ameisensäure, 0,01 M NaOH, 8 M Harnstoff

Puffer "C" als Wannepuffer:

Formiatpuffer mit Harnstoff -

0,2 M Ameisensäure, 0,08 M NaOH, 8 M Harnstoff,

Harnstoff pur:

zur Dissoziation isolierter Serumeiweißfraktionen.

2(β)-Mercaptoaethanol puriss. (FLUKA A. G.):

für die Reduktion der dissoziierten Proteine.

Jodacetamid pur. (FLUKA A. G.):

damit werden anschließend die dissoziierten und reduzierten Proteine alkyliert.

#### 2. Zusätzliche Geräte

##### 1 Elpho - Pipette

zum Pipettieren von 2-Mercaptoaethanol;

Einige selbstausgezogene Pipetten mit kapillarem Auslauf:

mit diesen läßt sich das Untersuchungsmaterial am saubersten in die Depotgräben füllen.

### 3. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials mit Harnstoff, 2-Mercaptoaethanol und Jodacetamid

Die Behandlung des Untersuchungsmaterials erfolgt im wesentlichen nach der Anleitung von POULIK M. D. (112).

- a) eine Proteinlösung von 1,5 g% Eiweißgehalt dialysiere man gegen Boratpuffer "A";
  - b) aus 10 ml Boratpuffer "A" und 14,5 g Harnstoff stelle man einen Puffer her mit annähernd 12 M Harnstoff/Liter;
  - c) zu 0,25 ml des harnstoffhaltigen Boratpuffers von etwa 35 °C Temp. (Harnstoff kristallisiert wegen der hohen Konzentration leicht aus) werden 0,25 ml der 1,5 g%-igen Proteinlösung pipettiert;  
- die Proteinlösung ist nun lediglich 0,75 %ig und enthält 6 M Harnstoff/Liter;
  - d) als nächstes Reagens gebe man, am besten mit einer Elpho-Pipette, 0,0008 ml 2-Mercaptoaethanol dazu; dies entspricht 0,0215 M 2-Mercaptoaethanol/Liter;
  - e) es folgt bei einer Temperatur von 36 °C im Brutschrank oder im Wasserbad eine Inkubation von 2 Std. Dauer;
  - f) nachdem 5,5 mg Jodacetamid, das bedeutet 0,06 M/L dazugefüllt wurden,
  - g) schließt sich eine Inkubation von nochmals 2 Std. an.
- Nun kann das Reagens in die Depotgräben gefüllt werden.

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Serumeiweißfraktionen ist in der vorliegenden Arbeit die ursprüngliche Methode von POULIK M. D. (112) in der neben beschriebenen Weise abgeändert worden.

POULIK M. D. beschreibt die Zubereitung einer 1 %-igen Proteinlösung in 0,1 mol Boratpuffer, pH 8,5 in 8 M Harnstoff und 0,02 M Mercaptoaethanol und 0,05 M Jodacetamid.

Als wichtigste Berichte zur Analyse von größeren Mengen isolierter  $\gamma$ -Globulin-Fractionen in ähnlicher Weise seien aus der einschlägigen Literatur angegeben:

EDELMAN G. M. (22); EDELMAN G. M. und POULIK M. D. (23); FLEISCHMAN J. B., PAIN R. H. und PORTER R. R. (37); SCHEURLE P. G. und TISCHENDORF F. W. (131). POULIK M. D. (116) beschreibt eine zweidimensionale Untersuchung von  $\gamma$ -Globulinen in einem Stärkegel, welches außer Harnstoff zugleich Mercaptoaethanol enthält - ein alkylierendes Reagens zur Erhaltung des monomeren Zustandes der Globulinuntereinheiten kann damit entbehrt werden.

#### 4. Arbeitsgang bei der Harnstoff- Stärkegel - Elektrophorese

##### Herstellung des harnstoffhaltigen Gels:

Das Gel wird angefertigt aus 14,5 g CONNAUGHT - Stärke pro 100 ml Formiatpuffer "B" (112, 23, 145). Für die übliche Kammer 2 mit den Dimensionen nach SMITHIES O. (144), welche hier zu bevorzugen ist, ist die 6-fache Menge ausreichend.

Ein niedrigerer Prozentsatz an Stärkegehalt (3) erwies sich wegen der zu geringen Viskosität als ungünstig.

Methodisch hat sich bewährt, zuerst den gut gekühlten harnstoffhaltigen Formiatpuffer "B" in die Saugflasche zu geben und langsam die abgewogene Menge Stärke einzurühren. In umgekehrter Weise verklumpt erfahrungsgemäß das Puffer-Stärke-Gemisch. Das Kochen geschieht auf die gewohnte Weise. Die Viskosität des noch heißen harnstoffhaltigen Gels ist im Vergleich mit der Viskosität des harnstofffreien Gels wesentlich niedriger. Durch wiederholtes Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe sind die zahlreichen Luftbläschen aus dem Gel zu entfernen.

##### Gießen des Gels:

Nun wird das außerordentlich flüssige Gel in den wie üblich vorbereiteten Trog gefüllt. Den Deckel klappe man derart auf den Trog, daß die Matrize im Deckel 12 cm von einer Schmalseite des Troges entfernt - diese Seite wird später zum anodischen Ende - in das Gel dringt.

Beim harnstoffhaltigen Gel darf man keinesfalls versäumen, etwa 30 Min. lang den Kamin im Deckel wiederholt mit noch flüssigem Gel ohne Luftblasen aufzufüllen, da zu Beginn des Erstarrens das Niveau des Gels im Kamin ständig sinkt. Zu diesem Zweck stelle man am besten etwas Gel zur Reserve in den Trockenschrank; hier bleibt das Reservegel flüssig.

Anschließend gibt man die Gelkammer in den Eisenschrank bei 4 °C. Frühestens nach 13 Stunden ist das Gel für das Weitere brauchbar; erfahrungsgemäß ist jedoch auch möglich, erst nach 20 Std. das Gel für die Elektrophorese als Träger zu verwenden.

##### Einbringung des Materials:

Bei wie beschrieben vorbehandeltem Untersuchungsmaterial wird kein Gemisch aus Proteinlösung und Gel angefertigt, sondern das entsprechend zubereitete Material selbst in die Depotgräben eingefüllt.

Es ist deshalb darauf zu achten, daß beim Abheben des Deckels vom Trog der feine Gelfilm am Boden des Depotgrabens nicht herausgerissen wird; sonst ist Gefahr gegeben, daß benachbarte zu untersuchende Substanzen ineinander überlaufen. Gegebenenfalls muß der Boden sorgfältig ausgebessert werden.

Zum Einfüllen in die Gräben eignen sich selbst ausgezogene Pipetten mit kapillarem Auslauf.

Untersuchungsmaterial und Pipetten sind zuvor im Brutschrank bei 36 °C vorgewärmt worden.

#### Vorbereitung zur Elektrophorese:

Wie schon früher ausgeführt, wird das Gel mit Paraffin überzogen und für die Elektrophorese vorbereitet.

Die Versuchsanordnung ist dieselbe (Fig. 14).

Lediglich der Wannenpuffer ist geändert; Formiatpuffer mit Harnstoff "C" (112). Man achte darauf, daß die Auftragstelle diesmal nach unten, d.h. näher zur Anode zu bringen ist, da unter den angegebenen Versuchsbedingungen sämtliche Trennungsprodukte kathodisch wandern !

#### Elektrophorese:

Die elektrophoretischen Bedingungen sind:

Eissschranktemperatur von 4 °C

Zeitdauer von 21 Stunden

Spannungsabfall von ca. 5,3 V/cm im Gel

- der Spannungsabfall in der kontrollierten

Meßstrecke (= 22 cm) beträgt dabei 117 Volt.

Die technischen Voraussetzungen zur Ausführung der Versuche gestatteten es nicht, höhere Spannungswerte, 6 V/cm in 24 Std., (23) oder in 16 Std. (112), anzuwenden, wie sie POULIK M. D. in der Originalmethode angibt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Elektrophoresebedingungen führten jedoch zu völlig ausreichenden Versuchsergebnissen.

#### Schneiden -Fixieren - Färben:

erfolgen unverändert wie beim harnstofffreien Gel.

Um die Handhabung des Gels bei diesen Arbeitsgängen zu erleichtern, stelle man nach Beendigung der Elektrophorese den Trog mit dem Gel etwa 5 Min. in die Gefriertruhe.

### Entfärben:

Das harnstoffhaltige Gel adsorbiert intensiv Amidoschwarz 10 B. Der Entfärbeprozess ist daher verlängert; eine optimale Freilegung der proteinhaltigen Zonen ist erfahrungsgemäß erst nach 4 - 5 Tagen erreicht.

### Aufbewahrung:

Etwa 2 Wochen kann das Gel mit den gefärbten Proteinbanden im Entfärbebad liegen, ohne daß das Spektrum der Trennlinien an Präzision verliert.

## IV. VERSUCHE

### zur Darstellung und Untersuchung von gamma-Globulinen mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese

#### IV. A. Untersuchungsgut:

1. Vollserum von 4 Gesunden, Ba. HJ., NN. a, b, c,  
4 Patienten mit  $\gamma_G$ -Plasmocytom,  
Ma. B., Ba. J., Zo. K., Bü. M.,  
2 Patienten mit  $\gamma_A$ -Plasmocytom,  
Ka. M., Ei. S.,  
4 Patienten mit Morbus Waldenström,  
Sp. Ch., P. G., Ma. P., Di. O.,

#### 2. Isolierte Serumeiweißfraktionen:

- a) Eine  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion eines Gesunden, Ba. HJ.;

Diese Fraktion wurde mit dem Verfahren der Gradientenelutionschromatographie auf einer DEAE-Cellulose-Säule (SERVA) dargestellt. Eine nähere Beschreibung des hier angewandten Verfahrens ist zu finden bei KNEDEL M. und FATEH A. (69, 70).

Anschließend prüfte man die Reinheit des Eluates:

Die Papierelektrophorese (nach TISELIUS S., 76) zeigte bei einem Proteingehalt von 1,3 g% keine Banden außerhalb des gamma-Globulin-Bereiches (Abb. 1).

Bei der Immunoelktrophorese (nach SCHEIDEGGER J.J., 125), angesetzt gegen Anti-Humanserum vom Kaninchen (Abb. 2) war lediglich die typische Präzipitationsichel des normalen  $\gamma_G$ -Globulins ausgebildet. Ansätze mit Anti- $\gamma_A$  (Abb. 5) von der Ziege bzw. Anti- $\gamma_M$  vom Pferd (Abb. 6) zeigten keine Präzipitation. Anti- $\gamma_G$  vom Kaninchen (Abb. 4) ergab mit der isolierten Fraktion Ba. HJ. eine Präzipitationslinie, die mit jener im Ansatz gegen Anti-Humanserum (Abb. 2) übereinstimmte. Der Proteingehalt der Fraktion Ba. HJ. betrug jeweils 1,5 g%.

Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge stellten einen einheitlichen 6,6 S Peak dar; der Proteingehalt war dabei 0,6 g%. (Abb. 3).

Bei der Reinheitsprüfung durch die Stärkegel-Elektrophorese betrug der

ursprüngliche Proteingehalt des Eluats 1,5 g% (Abb. 27, 29); durch die Anfertigung eines Serum-Gel-Gemisches im Verhältnis 1 : 1 wurde die Untersuchungssubstanz auf einen Proteingehalt von etwa 0,75 g% verdünnt. Diese Konzentration entsprach dem endgültigen Eiweißgehalt der Proteinlösung (0,75 g%) bei späteren Untersuchungen zur Analyse von Proteinuntereinheiten nach Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercaptoaethanol und Jodacetamid. Weist das Ergebnis der außerordentlich empfindlichen S.G.E. bei diesem Eiweißgehalt keine Verunreinigung auf, so kann man annehmen, daß die elektrophoretisch dargestellten Linien von Proteinuntereinheiten im harnstoffhaltigen Gel lediglich als Bruchstücke der zu untersuchenden  $\gamma$ -Globuline zu werten sind.

Diese Maßnahme mußte wegen der geringen Mengen des zur Verfügung stehenden Materials getroffen werden.

Bei der Darstellung von  $\gamma_G$ -Globulin Ba.HJ. (Abb. 27, 29) mit der S.G.E. ist außer dem  $\gamma_G$ -Globulin-Anteil keine weitere Serumeiweißkomponente zu sehen.

#### b) 4 isolierte pathologische $\gamma_G$ -Globulin-Fraktionen

von Patienten mit  $\gamma_G$ -Plasmocytom, Ma. B., Ba.J., Zo.K., Bü.M.;

Diese Fraktionen wurden auf einer DEAE-SEPHADEX-Säule (PHARMACIA), wie bei KNEDEL M. und FATEH A. (69, 70) beschrieben, isoliert dargestellt.

Die Reinheitsprüfung dieser pathologischen  $\gamma_G$ -Fraktionen mit der Papier-elektrophorese, Immunelektrophorese (Abb. 7 - 10) und Stärkegelelektrophorese (Abb. 29) wies auf keine Verunreinigung des jeweiligen Eluats hin. Auf eine genauere Darstellung der Prüfungsergebnisse sei an dieser Stelle verzichtet, da jene Fraktionen lediglich zum Zwecke der Demonstration von pathologischen  $\gamma_G$ -Globulinen mit der S.G.E. dienten, und nicht, wie die normale  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba.HJ. und die isolierten  $\gamma_M$ -Globulinanteile Sp.Ch., Pä.G., Ma.P., Di.O., zu weiteren Untersuchungen von Proteinuntereinheiten herangezogen wurden.

#### c) isolierte $\gamma_M$ -Globulinanteile von 4 Patienten mit Morbus Waldenström; Sp.Ch., Pä.G., Ma.P., Di.O.;

Die Diagnose Morbus Waldenström war gestellt worden auf Grund von klinischen Symptomen, manifestiert durch pathologische Befunde bei Untersuchungen des Serums mit der Papierelektrophorese (Abb. 11, 12, 13, 14) und Immunelektrophorese (Abb. 15, 16, 17, 18) und der Ultrazentrifuge

(Abb. 19, 20, 21, 22); siehe die Tabelle.

### Isolierungsverfahren

Die Isolierung erfolgte mit der Euglobulinfüllung; das Prinzip ist dabei folgendes: als sog. "Euglobuline" (26) sind die  $\gamma$ -Makroglobuline bei ihrem isoelektrischen Punkt bei ausreichend niedriger Ionenstärke unlöslich, gehen aber bei höherer Ionenstärke oder bei höherem oder niedrigerem pH-Wert wieder in Lösung über.

Durch Verdünnen des pathologischen Serums mit Aqua bidest. im Verhältnis 1 : 10 wurde der Makroglobulinanteil ausgefällt (84), dann das Reagens 10 Min. lang zentrifugiert und der Überstand über dem ausgefällten Protein-niederschlag abgesaugt. Mit physiologischer Kochsalzlösung brachte man den Niederschlag in Lösung und das Protein anschließend durch Verdünnen mit Aqua bidest. wiederum zum Ausfall. Diese Arbeitsfolge "Wasserfällung-Zentrifugieren-Absaugen-Auflösen mit Kochsalzlösung" wurde etwa 8 - 10 mal wiederholt.

### Reinheitsprüfung:

Der Prozentsatz der Proteinlösung zur papierelektrophoretischen (Abb. 11 - 14) und immunoelktrophoretischen (Abb. 15 - 18) Untersuchung betrug 1,3 g%. Die Ergebnisse zeigten charakteristisch die pathologischen Komponenten und wiesen auf keine Verunreinigung im Bereich anderer Serumeiweißkomponenten hin.

Analysen mit der Ultrazentrifuge zeigten bei den 4 Eluaten lediglich Makroglobulinkomponenten (Tabelle und Abb. 19 - 21). Im Fall Di.O. gab die Untersuchung mit der Ultrazentrifuge beim Vollserum 2 Makroglobulinkomponenten an; bei dem aus dem Vollserum isolierten Makroglobulinanteil hingegen stellten sich 3 verschiedene Makroglobulin-Peaks dar; erst in relativ hoher Konzentration waren bei Di.O. im Gegensatz zu den anderen Fällen Sp.Ch., P.A.G., Ma.B., 3 Einheiten zu erkennen. Der Proteingehalt des Substrates betrug 0,6 %.

Auch das Ergebnis der Stärkegel-Elektrophorese (Abb. 32) sprach für Reinheit der isolierten  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe. Weder im normalen  $\gamma$ -Globulin-Bereich, noch im Bereich der übrigen Serumeiweißkomponenten waren Banden zu erkennen. Die  $\gamma_M$ -Komponenten sind charakteristischerweise an der Startstelle liegen geblieben.

Wie schon bei der Prüfung der normalen  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba.HJ. erläutert, wurde zur Herstellung eines Serum-Gel-Gemisches als Ausgangs-

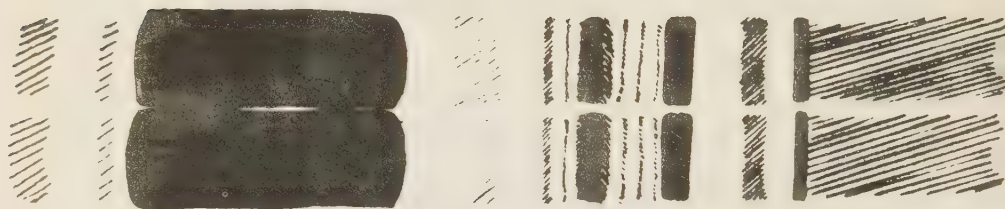
## 1.

Elektrophoretische Auftrennung im Stärkegel unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Das Gesamtspektrum der Serumproteinfraktionen bei der S. G. E. (Abb. 23) einschließlich den Präalbuminen wurde erhalten bei folgenden Bedingungen:

Eisschranktemp. von  $4^{\circ}\text{C}$ ,  
 Zeitdauer von 14 Std.,  
 Spannungsabfall von 5 V/cm im Gel;

Fig. 15 zeigt schematisch das Ergebnis eines normalen Vollserums.



Eine Dehnung der Gesamtlänge der elektrophoretischen Auftrennung (Abb. 24, Fig. 16) erreichte man bei:

Eisschranktemp. von  $4^{\circ}\text{C}$ ,  
 Zeitdauer von 15 Std.,  
 Spannungsabfall von 5,5 V/cm im Gel;

Unter diesen Bedingungen sind die Präalbumine und ein Teil der Albuminkomponente anodisch aus dem Gelblock gewandert; die übrigen Proteinkomponenten sind jedoch deutlicher voneinander getrennt als in Ergebnis

Abb. 23 Fig. 15. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von isolierten Serumeiweißkomponenten von Interesse.

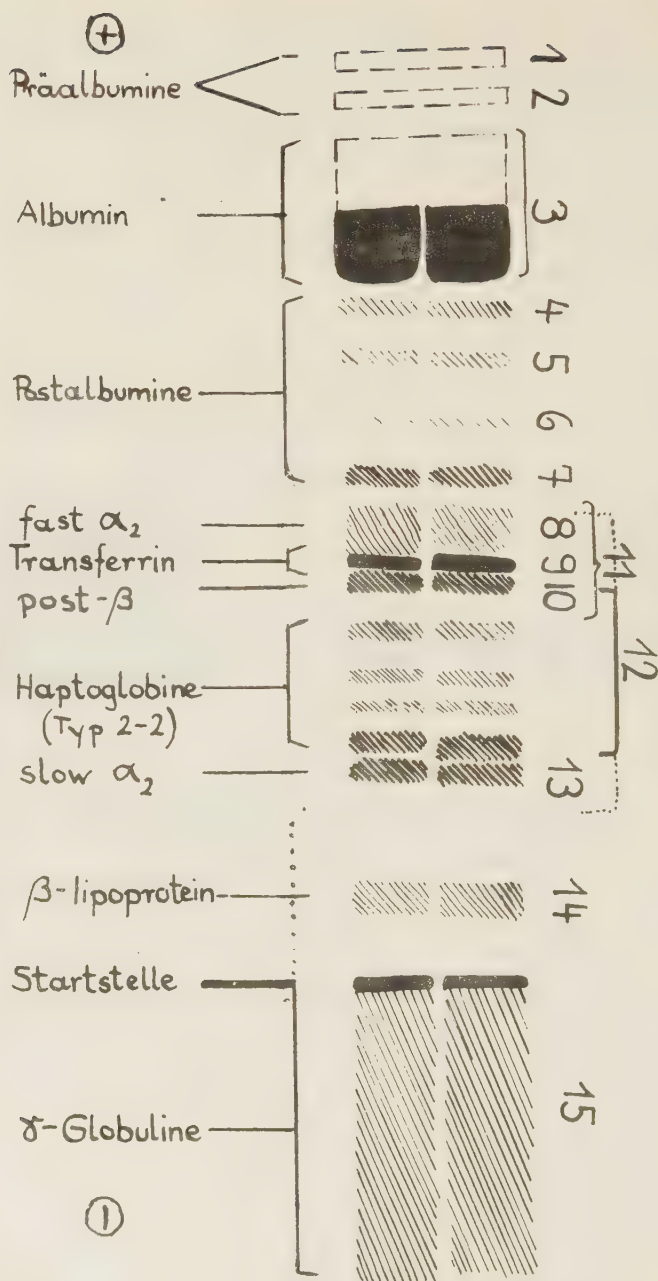
Anhand des Versuchsergebnisses in Fig. 16 sei das Elektropherogramm der S. G. E. bei Normalserum erläutert:

Fig. 16: abgebildet auf S. 50.

Zeichenerklärung zur Fig. 16:

- 1 tryptophanreiches Präalbumin
- 2 saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein
- 3 Albuminkomplex mit  $\alpha_1$ -Antitrypsin
- 4-7 Zone der Postalbumine (2-4 Banden) mit Anteilen der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Komponente der papierelektrophoretischen Auftrennung;
- 4 und 5 sind wahrscheinlich Gc-Globulin 2-1
- 6  $\alpha_2$ HS-Glykoprotein
- 7  $\alpha_1$ X-Glykoprotein
- 8 sog. fast  $\alpha_2$   
enthält Coeruloplasmin, Hämo-pexin, Inter- $\alpha$ -Trypsininhib. 4,4 S, Haptoglobinantile vom Typ 2-1, 1-1;
- 9 Transferrinkomplex = Beta C  
zusätzlich alk. Phosphatase
- 10 sog. post  $\beta$   
enthält Inter- $\alpha$ -Trypsininhib., 6,4 S und  $\beta_{1A}$ -Globulin;
- 11 in diesem Bereich breitet sich  $\alpha$ -Lipoprotein aus;
- 12 Haptoglobinkomplex; in dieser Darstellung Typ 2-1; genauere Darstellung des Haptoglobinkomplexes in Fig. 17
- 13 sog. slow  $\alpha_2$
- 14  $\beta$ -Lipoprotein
- 15  $\gamma$ -Globuline  
genauere Darstellung der  $\gamma$ -Globulinkomponenten in Fig. 25

Fig. 16 Schema der Proteinbanden eines Normalserums nach Elektrophorese im Stärkegel



Lokalisation der Serumproteine: (nach BEHRINGWERK-Mitteilungen, 3, FINE, A., 33, SCHEUREN P. G., 127)





Fig. 18: a) unverändertes Serum )  
b) Serum-Gel-Gemisch ) im Depotspalt

Nach mehreren vergleichenden Versuchen schloß sich der Verfasser der vorliegenden Arbeit der Methode nach FINE A. et al. an; jedoch dahingehend verändert, daß ein Gel mit niedrigerer Stärkekonzentration verwendet wurde, um eine Homogenität des Gemisches aus Gel und Untersuchungsmaterial (Serum sowie Serumeiweißfraktion) sicherzustellen.

Da ein Gel-Gemisch sauberer eingefüllt werden kann als eine Substanz geringerer Viskosität, bleibt - insbes. wenn, wie beschrieben, ein Filterpapierstreifen auf das Gel zuvor gelegt wird - das Gel unmittelbar um die Auftragstelle befreit von Unsauberkeiten; jene könnten eine abnorme Proteinansammlung am Depot vortäuschen. Die in dieser Arbeit angegebene Methode ist deshalb vorzuziehen.

Es kommt vor, daß beim Abheben des Kammerdeckels vom Geltrog die feine Gelschicht am Boden jeden Depotspaltes einreißt. Füllt man anschließend die untersuchende Substanz selbst in das Depot ein, so besteht die Gefahr einer Vermischung benachbarter Untersuchungsproben; mit einem Gelgemisch läßt sich dies weitgehend verhindern.

Wurde bei den Versuchen in das Depot Serum alleine eingefüllt, so hatten sich während der Elektrophorese an der kathodischen Seite jeder Depotstelle Proteinanteile in Form kathodenwärts konkaver "Flügel" im Stärkegel

lokalisiert. Dies ist vielleicht damit zu erklären, daß bei ungenügender Füllung des Depotspaltes schon von vorneherein, oder durch Volumenabnahme der Untersuchungssubstanz infolge des elektrophoretischen Materialtransportes, in Senkrechtstellung des Gelblockes der Flüssigkeitsspiegel im Depotspalt durch Adhäsionskräfte nach oben, d. h. hier zur Kathode hin, konkav ist. Bei Vermischung mit Stärkegel hingegen ist dieser Effekt durch die "Gelstütze" des Untersuchungsmaterials offensichtlich größtenteils beseitigt.

Die erreichte Auftrennung bei der hier angewandten Methode ist wesentlich verbessert, aus den schon erwähnten Gründen und wegen des Verdünnungseffektes, sowie der Tatsache, daß das Untersuchungsmaterial im Gelgemisch bereits vor Beginn der Elektrophorese an den spezifischen Eigenschaften der Trägersubstanz ausgesetzt ist.

Abb. 25 und Fig. 18 demonstrieren deutlich die verbesserte Auftrennung bei Verwendung eines Serum-Gel-Gemisches gegenüber den Ergebnissen nach Einfüllung des unveränderten Serums:

- die einzelnen Proteinbanden heben sich klarer voneinander ab,
- die "Flügel" kathodenwärts der Depotstelle sind fast völlig beseitigt,
- insgesamt ist das Gel um die Auftragstelle sauberer.

### 3. Normalserum;

Darstellung von 4 Vollseren und 1 normalen  $\gamma_G$ -Globulin

Abb. 26 und Fig. 19 zeigen die elektrophoretische Auftrennung von 4 Normalseren, Ba. HJ. und N. N. a, b, c; Serum Ba. HJ., N. N. a, N. N. c, weisen Haptoglobintyp 2-1 auf, N N b Typ 2-2

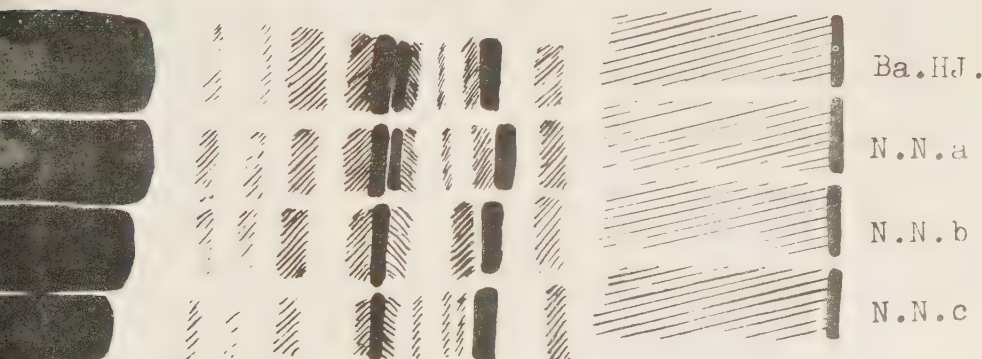


Fig. 19: Auftrennung von 4 Normalseren

In Abb. 27 und Fig. 20 ist die  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ. dargestellt.

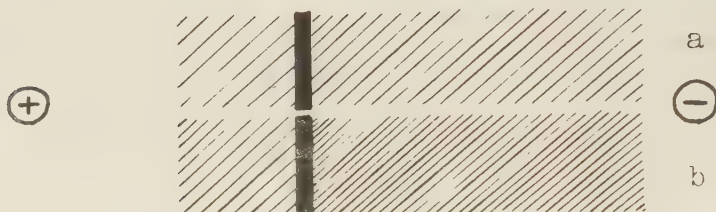


Fig. 20  $\gamma_G$ -Globulin Ba. HJ.;

a = 0,50 g%; b = 0,75 g%

Wie schon früher berichtet und aus Abb. 26 und 27 bzw. in Fig. 19 und 20 ersichtlich, wandert der Hauptanteil des normalen  $\gamma_G$ -Globulins in Stärkegel infolge Endosmose kathodenwärts.

Die meisten Autoren, die sich mit der elektrophoretischen Darstellung von Serumproteinen im Stärkegel auseinandergesetzt haben, geben lediglich diese kathodische Ausdehnung als gamma-Globulin-Bereich an. Scheurlen P. G. (127) konnte jedoch mit der Stärkegelimmunoelktrophorese nachweisen, daß sich ein kleiner Anteil auch anodenwärts über die Auftragestelle hinaus ausbreitet. Dies zeigte ebenso LORBER A. (83) anhand der Auftrennung eines käuflichen gamma-Globulin-Präparates. Auch Ergebnisse der 2-dimensionalen S. G. E. beweisen Angaben (147, 117, 111, 110).

FAHEY J. L. (31) stellte mit dem Verfahren der Stärkegelimmunoelktrophorese fest, daß in dem anodisch wandernden Anteil  $\gamma_A$ -Globulin enthalten ist; die Präzipitationssichel dehnte sich von der Startstelle bis über die slow-Komponente aus. SCHEURLLEN P. G. (127) konnte das  $\gamma_A$ -Globulin als Zone lediglich anodisch und kathodisch um das  $\beta$ -Lipoproteinband lokalisieren.

Entsprechend dem Versuchsergebnis in Abb. 27 und Fig. 20 ist in dem anodisch ausgerichteten Teil der  $\gamma$ -Globuline offensichtlich außer dem von SCHEURLLEN P. G. und FAHEY J. L. beschriebenen  $\gamma_A$ -Globulin auch ein bestimmter Anteil der  $\gamma_G$ -Komponente lokalisiert; diese lehnt sich etwa bis zur  $\beta$ -Lipoproteinlinie aus (Abb. 29, 32). Daß es sich in der hiesigen Arbeit bei dem anodisch wandernden Teil der isolierten Fraktion Ba. HJ. ausschließlich um  $\gamma_G$ -Globulin handelt, ist aus den Ergebnissen der Papierelektrophorese (Abb. 1), Ultrazentrifuge (Abb. 2) und der Immunoelktrophorese im An- z gegen An-

Human-Vollserum (Abb. 2), Anti-  $\gamma_G$  (Abb. 4), Anti-  $\gamma_A$  (Abb. 5) und Anti-  $\gamma_M$  (Abb. 6) zu entnehmen.

"Beim Normalserum ist der kathodische Teil des  $\gamma$ -Globulins nach Art. einer breitbasigen GAUSS-Verteilungskurve gelagert" (130). Bei den in dieser Arbeit angewandten Versuchsbedingungen stellte sich die  $\gamma$ -Globulin-Zone beim Serum Gesunder homogen dar; innerhalb dieses Bezirkes zeichneten sich auch bei Verdünnung (Fig. 20, Abb. 27) keine gesonderten Zonen ab. Ob die manchmal angedeuteten Unregelmäßigkeiten in der  $\gamma$ -Globulinzone als Untereinheiten angesehen werden können, ist zweifelhaft (z. B. Abb. 25 und 26). Das Ergebnis der Homogenität stimmt überein mit den meisten Angaben aus der einschlägigen Literatur.

FINE A. et al. (33, 34) dagegen berichten - allerdings bei anderen Versuchsbedingungen - von 2 Zonen innerhalb der kathodischen gamma-Globulin-Strecke.

#### 4. $\gamma_G$ -Plasmocytom:

Darstellung von 4 Vollseren und den daraus isolierten pathologischen  $\gamma_G$ -Globulinen

Einige typische Proteinspektren von 4 Vollseren Ma. B., Zo. K., Bl. J., Bü. M., mit pathologischen  $\gamma_G$ -Globulin-Anteilen seien in Abb. 28, Fig. 21 gezeigt. In den äußersten Laufstrecken ist zum Vergleich das normale Vollserum Ba. HJ. aufgetrennt.

Die abnorm stark gefärbten Proteinanhäufungen stellen jeweils den pathologischen Anteil des  $\gamma_G$ -Globulins dar; sie wirken homogen.

Erst in Verdünnung sind teilweise Banden innerhalb der abnormen Proteinkomplexe wahrnehmbar. In Abb. 29 und Fig. 22 sind die isolierten pathologischen  $\gamma_G$ -Komponenten dieser 4 Seren mit einem endgültigen Proteingehalt von 0,5 g% im Stärkegel elektrophoretisch aufgetrennt. Gleichzeitig ist das normale Vollserum Ba. HJ. sowie das  $\gamma_G$ -Globulin Ba. HJ. für Vergleichszwecke mit dargestellt.



Fig. 21: Normalserum Ba.HJ.

4  $\gamma$ -Globulin-Seren Ma.B, Zo.K., Bl.J., Bl.M

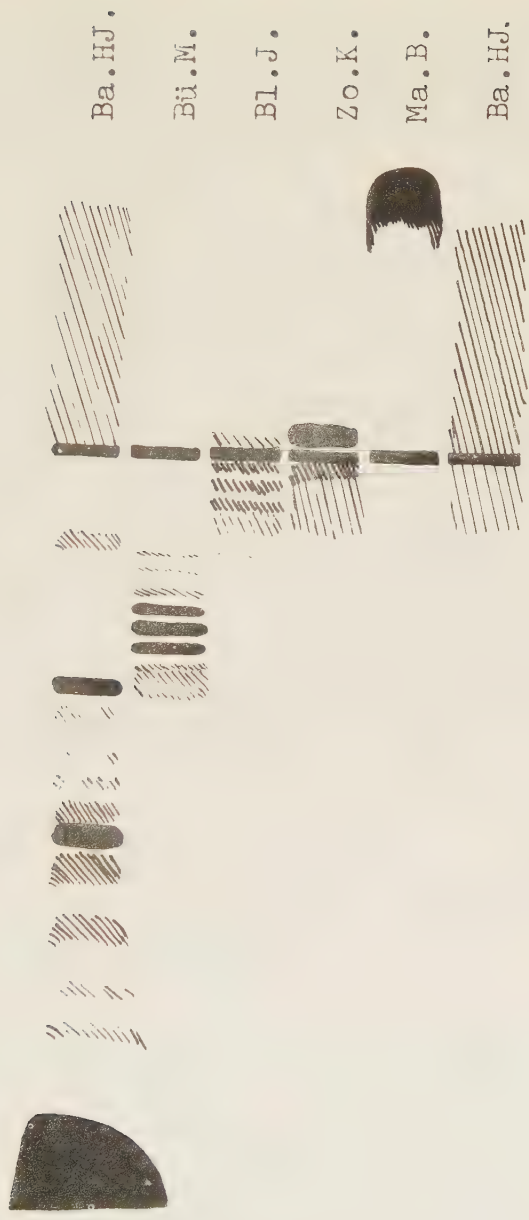


Fig. 22 Normalserum Ba.HJ., normales  $\gamma_G$ -Globulin Ba.HJ.  
 Plasmocytom-  $\gamma_G$ -Globulin Ma.B., Zo.K., Bl.J., Bü.M.

Fraktionen Zo. K., Bl. J., Bü. M., weisen deutlich eine Heterogenität der pathologischen Komponenten auf, und zwar in der für  $\gamma_G$ -Plasmocytom-Globuline charakteristischen Art; nahezu regelmäßig folgen mehrere etwa gleichgroße Banden. Fraktion Ma. B. hingegen ergibt nur eine diffuse Proteinanhäufung und scheint eine Homogenität zu besitzen. FAHEY J. L. (31) teilt mit, daß kathodisch wandernde pathologische  $\gamma_G$ -Globuline des öfteren homogen erscheinen.

Die pathologischen Globulin-Fractionen geben den typischen Lokalisationsbereich für den Verband dieser abnormen Komponenten an; die Strecke von slow  $\alpha$  bis kathodisch der normalen  $\gamma_G$ -Globulinzone.

Es sei an dieser Stelle auf Berichte von SCHEURLIN P. K. (132) hingewiesen, daß es eine Eigenart der heterogenen  $\gamma_G$ -Myelomglobuline sei, auch nach Behandlung mit Cysteamin das elektrophoretische Bild der Heterogenität nicht zu verändern; die Heterogenität ist demnach nicht durch Komponenten unterschiedlichen Molekulargewichtes bedingt. Da mit wenigen Ausnahmen die in der S. G. E. feststellbare Heterogenität des  $\gamma_G$ -Myelom-Globulins nicht auch papierelektrophoretisch, immunologisch und sedimentatorisch nachweisbar und durch Cysteamin nicht beeinflussbar ist, spricht FAHEY J. S. (31) von einer sog. "elektrophoretischen Heterogenität des  $\gamma_G$ -Myelom-Globulins im Stärkegel", im Unterschied zur sog. "polymeren Heterogenität der  $\gamma_A$ -Myelom-Globuline" (siehe später). Weshalb die Heterogenität gerade in der S. G. E. nachweisbar wird, läßt sich wahrscheinlich mit dem "Siebeffekt" erklären, der die strukturellen Feinheiten der Paraproteine berücksichtigt.

ENGLE P. C. et al. (29), FLYNN F. V. et al. (41), OWEN J. A. et al. (98) LAURELL C. B. (81), insbes. SCHEURLIN P. G. (130, 129) und FAHEY J. L. (31) beschäftigten sich ausführlich mit der Heterogenität des Plasmocytom- $\gamma_G$ -Globulins bei der elektrophoretischen Auftrennung im Stärkegel. An einem großen Untersuchungsgut konnten sie eine Individualspezifität in Anzahl, Anordnung und Lage der Subfraktionen bei Myelom-Seren feststellen.

Das Versuchsergebnis Abb. 28, Fig. 21 weist auf folgenden Befund hin; bei den Patientenseren Ma. B. und Zo. K. hebt sich im Proteinspektrum, im Gegensatz zu den mitlaufenden Vergleichsseren, jeweils eine verstärkte Linie in der Postalbuminzone hervor.

Gemäß Beschreibungen von SCHEURLIN P. G. (131) könnte es sich in diesen beiden Fällen um  $\gamma_\mu$ -Globulin handeln. Ist das  $\gamma_\mu$ -Globulin durch andere Serumproteine gleicher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit nicht maskiert, so kann es im Proteinspektrum angegeben sein; die Lokalisation

variiert, ist aber im Postalbuminbereich gehäuft.

Untersuchungen auf Bence-Jones-Protein ergaben in den Fällen Ma. B. und Zo. K. positive Ergebnisse; ob die beiden auffälligen Linien im Stärkegel jedoch tatsächlich  $\gamma_{\mu}$ -Globulin darstellen, wäre immunologisch mit der S. G. E. noch genauer zu untersuchen.

Beim Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der pathologischen Serumanteile im Agargel, bei der Immunoelktrophorese und im Stärkegel ergibt sich folgender Nebebefund:

- Alle immunologisch abnormen Präzipitationslinien sind als Ausbuchtungen innerhalb des normalen  $\gamma_G$ -Globulinbereiches ausgebildet; Abb. 7 - 10.
- Bei der elektrophoretischen Auftrennung im Stärkegel dagegen zeigt sich, in Übereinstimmung mit SCHEURLIN P. G. (130, 129), daß in einzelnen Seren pathologische  $\gamma_G$ -Komponenten auftreten, die eine dem normalen  $\gamma_G$ -Globulin nicht eigene Wanderungsgeschwindigkeit besitzen; Fraktion Ma. B. in Abb. 28, Fig. 21 übertrifft die Ausdehnung der Fraktion Ba. HJ. am kathodischen Ende, Fraktion Bü. M. am anodischen Ende.
- In der Ausrichtung der abnormen Komponenten zu den elektrischen Polen stimmen die Ergebnisse der Immunoelktrophorese und der Stärkegelelektrophorese überein; bei ersterer in Relation zum normalen  $\gamma_G$ -Globulinbereich, bei der S. G. E. in Relation zur Startstelle; Komponente Bü. M. richtet sich zur Anode aus, Komponente Ma. B. zur Kathode; Komponente Bl. J. und Zo. K. liegen dazwischen, Bl. J. etwas mehr anodisch verlagert als Zo. K.

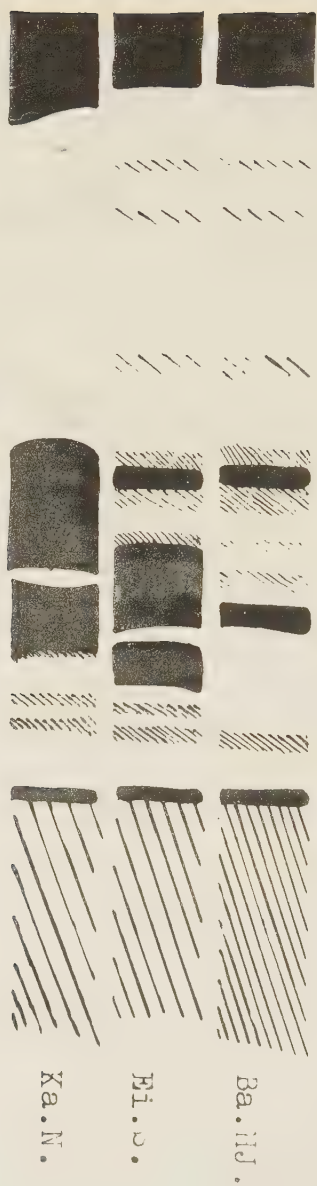
## 5. $\gamma_A$ -Plasmocytom:

Darstellung von 2 pathologischen Vollseren

Die 2 Vollseren Ka. N., Ei. S. in Abb. 30 und Fig. 23 zeigen deutlich die für  $\gamma_A$ -Plasmocytom charakteristischen Bilder der elektrophoretischen Auftrennung im Stärkegel:

- Mehrere abnorme, durch unterschiedliche Breite und Intensität ausgezeichnete Banden sind das Auffallende; auch beim  $\gamma_A$ -Plasmocytom ist also im Stärkegel eine Heterogenität des pathologischen gamma-Globulins zu sehen.
- Der Lokalisationsbereich dieser Komponenten entspricht der Strecke zwischen Transferrin und der Startstelle beim normalen Vollserum Ba. HJ.

Fig. 23: Normalserum Ba.H.  
 $\chi_A$ -Myelom-Vollseren



- Bei Serum Ka. N. kann man beobachten, daß die am weitesten anodisch ausgerichtete anormale Zone die stärkste Konzentration besitzt.

SCHEURLIN P. G. (132) bezeichnet die rascher wandernden abnormen Zonen als sog. "Hauptkomponenten", die langsameren als sog. "Nebenkomponenten"; mit der Ultrazentrifuge konnte er aufweisen, daß die "Hauptkomponenten" 6-7 S Einheiten sind, die "Nebenkomponenten" dagegen rascher sedimentieren. Diese Tatsache und die Beweisführung von SCHEURLIN P. G., daß nach Inkubation mit Cysteamin die sog. Nebenkomponenten im elektro-phoretischen Bild verschwinden, die sog. Hauptkomponenten dagegen in ihrer Intensität verstärkt sind, sprechen dafür, daß die Heterogenität des Plasmocytom- $\gamma_A$ -Globulins in der Polymerität der langsamer wandernden, groß-molekularen Komponenten aus Einheiten der rascher wandernden  $\gamma_A$ -Gruppen begründet ist. FAHEY J. S. (31) prägte in diesem Zusammenhang den Begriff des "polymeren Typus der Heterogenität in der S. G. E.". Das Auftreten von Haupt- und Nebenkomponenten im Stärkegel ist wiederum ein Ergebnis der "Siebwirkung" des Stärkegels.

#### 6. $\gamma_M$ -Makroglobulinaemie:

Darstellung von 4 Patientenseren, sowie deren isolierten gamma-Makroglobulin-Komplexe

Im Vergleich mit dem Normalserum Ba. HJ. sind, abgesehen von einigen qualitativen Veränderungen einzelner Linien der Patientenseren (bes. Ma. P.), keine abnormen Besonderheiten zu erkennen.

Die Darstellung in Abb. 32 zur Reinheitsprüfung der isolierten  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe demonstriert typisch das Verhalten dieser Globuline im Stärkegel: sie sind an der Startstelle liegen geblieben und nicht in das Gel eingewandert.

Verschiedene Autoren (36, 140, 35, 28, 117, 81) teilen mit, daß sich der "Siebeffekt" der Gelmatrix, die Selektivierung nach Form und Größe der Proteinmoleküle, bei gamma-Makroglobulinen in der Art auswirkt, daß jene wegen ihrer Größe und der Abweichung ihrer Form von der Kugelgestalt nicht in das Gel eindringen können, sondern an der Startstelle liegen bleiben. Neuerdings hat SCHEURLIN P. G. (134) allerdings beobachtet, daß in einigen Fällen abnormes  $\gamma_M$ -Globulin als atypisches Band im Stärkegel anodwärts der Startstelle zu finden ist; mit der Stärkegel-Immunoelktrophorese konnte SCHEURLIN P. G. diese Linien als  $\gamma_M$ -Globuline identifizieren. Lediglich KALDOR G. et al. (66) berichtet Ähnliches.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten pathologischen Seren könnte lediglich

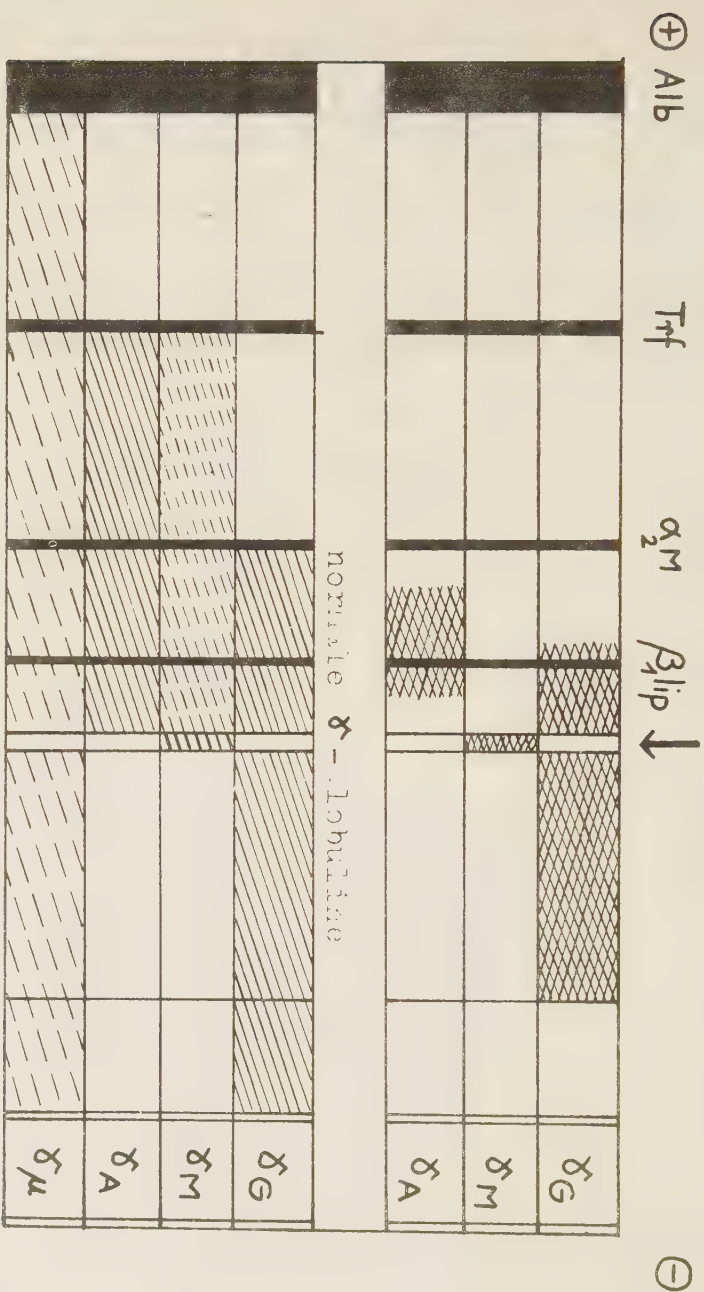


Fig. 24: Normalserum Ba.HJ.  
 4 Patientenseren bei Morbus Waldenström,  
 Sp.Ch., Pä.G., Ma.F., Di.O.

im Fall P<sub>ä</sub>.G. eine derartige  $\gamma$ -Makroglobulin-Einheit vermutet werden: abweichend von den Vergleichsseren ist zwischen der Startstelle und der  $\beta$ -Lipoprotein-Linie zusätzlich eine schwache Linie ausgebildet. Gemäß Abb. 32 ist diese etwaige  $\gamma_M$ -Komponente in dem isolierten  $\gamma_M$ -Komplex P<sub>ä</sub>.G. jedoch nicht erfaßt.

## 7. Lokalisation der gamma-Globulin-Anteile

Aus den eigenen Versuchsergebnissen, ergänzt durch Beobachtungen aus der einschlägigen Literatur, ergibt sich von der Lokalisation der gamma-Globulin-Anteile bei der Stärkegelelektrophorese etwa folgendes Bild:



abnorme  $\gamma$ -Globuline

Fig. 25: Lokalisation der gamma-Globulin-Antelle

## 8. Darstellung von Dissoziationsprodukten einer normalen

### $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion

Abb. 33, Fig. 26 zeigt den Versuch, isoliertes  $\gamma_G$ -Globulin, Ba.HJ., in Untereinheiten aufzuteilen. Wie schon in Teil III B in Einzelheiten dargestellt, erfolgte die Dissozierung der  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion in erster Linie nach Angaben von EDELMAN G. M. und POULIK M. D. (112, 23): Spaltung der Wasserstoffbrücken mit Harnstoff, Spaltung der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoaethanol und anschließend Alkylierung der frei werdenden SH-Gruppen mit Jodacetamid.

Es war von Interesse, in den verschiedenen Schritten der Materialaufarbeitung den Effekt der jeweiligen Behandlung mit der Stärkegel-Elektrophorese zu erfassen (Fig. 26) Abb. 33

Schritt 1: Effekt der Wasserstoffbrücken-Spaltung durch Harnstoff im Proteinreagens und im Gelpuffer.

Lediglich auf der kathodischen Seite der Startstelle sind Proteinhäufungen vorhanden. Zwei diffusen schwachen Banden folgt etwa mit der doppelten Wanderungsgeschwindigkeit ein stark gefärbtes Proteinband, dessen Farbintensität sich in Richtung Kathode konzentriert. Ob es sich bei der Nuanzierung innerhalb dieses breiten Bandes um differente Untereinheiten handelt, oder ob sie nur als Folge des sog. "tailing Effektes" betrachtet werden müssen, kommt in diesem Stadium der Vorbehandlung nicht klar zur Darstellung. Weiter kathodisch hebt sich von dem Hauptband eine zusätzliche, diffuse Linie scharf ab.

Schritt 2: Effekt der Disulfidbrücken-Spaltung und Reduzierung durch 2-Mercaptoaethanol.

Das Proteinmuster ist wiederum ausschließlich kathodenwärts ausgerichtet; es ist nun stark verändert. Unmittelbar kathodisch der Auftragestelle zeigt sich eine diffuse Proteinhäufung a; zwei weitere Streifen b und c lokalisieren sich etwa in der Mitte der gesamten Trennstrecke; jene näher zur Startstelle, Linie B, scheint von einer geringeren Konzentration zu sein, als Linie c. Weiter kathodenwärts folgen 2 relativ breite Zonen, d und e, von denen wiederum die der Anode näher liegende Linie die schwächer gefärbte ist. Das gesamte Proteinspektrum läuft zur Kathode hin in einem diffusen Band f aus.

Schritt 3: Effekt der Alkylierung von frei werdenden SH-Gruppen durch Jodacetamid.

Erfahrungsgemäß reaggregieren am Sauerstoff der Luft die einzelnen Spaltprodukte aus Schritt 2 teilweise zu größeren Molekülen. Bei Schritt 2 ist dieses Reaggregationsprodukt kathodisch der Auftragestelle liegen geblieben

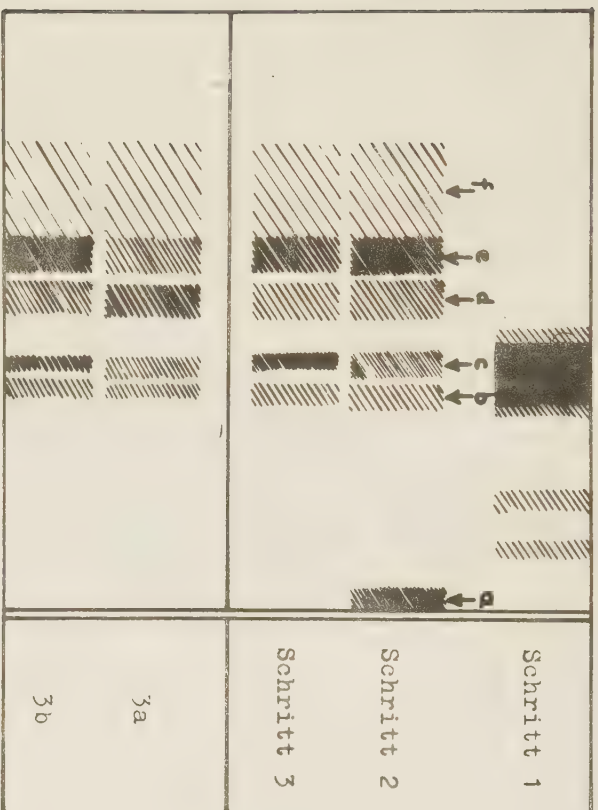


Fig. 26 : Stufen der Materialaufarbeitung eines  $\gamma$ -Globulins Ba. Hf.

und als Zone a dargestellt. In Schritt 3 ist unter der Wirkung von Jod-acetamid dieses Proteinband beseitigt.

Ansonsten zeigen die Ergebnisse von Schritt 2 und 3 keine besonderen Unterschiede. Bei Schritt 3 ist eventuell zusätzlich eine Unterteilung von Band f erkennbar.

In Abb. 33 (3a und 3b) und Fig. 26 (3a und 3b) wird die Abhängigkeit der Proteindissoziation von der Konzentration des reduzierenden Agens gezeigt:

3a demonstriert das Ergebnis bei verminderter Molarität des Mercapto-aethanols (0,013 M/L); Band b und c heben sich nur gering voneinander ab; Band d ist gegenüber Band e in seiner Farbintensität verstärkt.

3b gibt das Ergebnis nach erhöhter Molarität des Mercaptoaethanols (0,034 M/L) und verlängerter Inkubationszeit (6 Std.) wieder. Band b und c unterscheiden sich deutlich voneinander; die Farbintensität von Band e ist höher als jene von Band d.

Die Ergebnisse von Abb. 33, Schritt 3 und Abb. 33, 3b unterscheiden sich nicht bemerkenswert.

Aus dem Ergebnis von Schritt 1 kann man entnehmen, daß Wasserstoffbrücken maßgeblich an der Strukturgebung des  $\gamma_G$ -Globulins beteiligt sind. Sie verleihen offensichtlich entscheidend dem Molekül das Bild der Homogenität im nativen Zustand. Nach Aufhebung dieser Bindungen durch Harnstoff wird das  $\gamma_G$ -Globulin in seiner Einheit derart verändert, daß Komponenten sich darstellen, die infolge von Differenzen in Ladung, Molekülgröße und -Form verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten in der S. G. E. aufweisen. EDELMAN G. M. (22) beschreibt in diesem Zusammenhang eine Erniedrigung des Molekulargewichtes der 7S-Moleküle,  $M_{app} = 192\,000$ , unter der Einwirkung von Harnstoff zu Werten von  $M_{app} = 158\,000$ .

Schritt 2 und 3 zeigen eine weitere Subfraktionierung durch Reduktion, stabilisiert durch anschließende Alkylierung; dies entspricht sedimentatorischen Bestimmungen anderer Autoren (22, 37, 23, 24); sie berichten von einer Zerkleinerung der  $\gamma$ -Globulin-Moleküle von 6-7S-Einheiten zu 2,3S-Einheiten. Das Molekulargewicht ist um 1/3 bis 1/4 des Wertes im Nativzustand auf einen ungefähren Wert  $M_{app} = 48\,000$  vermindert.

Das Proteilmuster in Schritt 2 und 3 stimmt überein mit Untersuchungsergebnissen von 7S-Gamma-Globulin Dissoziationsprodukten von EDELMAN G. M. und POULIK M. D. (23), FLEISCHMAN J. B. et al. (37) und POULIK M. D. (114, 115). VAERMAN J. P. et al. (156) gelangten bei der elektro-

phoretischen Auftrennung eines  $\gamma$ -Globulin-Dissoziationsproduktes im Stärkegel allerdings zu einem anderen Ergebnis als der Verfasser der vorliegenden Arbeit: lediglich 2 Komponenten konnten nachgewiesen werden; ihre Lokalisation entsprach etwa jener von Band d mit e und Band f. Das unterschiedliche Ergebnis wäre einerseits damit zu erklären, daß evtl. das von VAERMAN J. P. subfraktionierte  $\gamma$ -Globulin nicht die gesamte chromatographisch isolierbare  $\gamma$ -Globulin-Fraktion enthält, wie dies in eigenen Fraktionierungsversuchen auf DEAE-Cellulose-Säulen bemerkt werden konnte. Andererseits wäre zu erwägen, ob Fraktion Ba. HJ. verunreinigt ist; durch sedimentatorische, immunologische und elektrophoretische Überprüfung konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Schließlich ist noch daran zu denken, daß die Reduktion in Schritt 2 und 3 ungenügend ist, und die Ausbildung von Band b und c, sowie die Doppelung von Band d und e darin begründet sind. Dazu zeigen aber die Ergebnisse in Abb. 33 (3a und 3b), daß im Rahmen der in der Literatur üblichen Mengen an Mercaptoaethanol und der Länge der Inkubationszeit bei Mikromengen von Untersuchungsgut, die Anzahl der Banden weder zu- noch abnimmt, sondern lediglich eine quantitative Verschiebung in der Farbintensität deutlich wird.

Über die Charakterisierung des Elektropherogrammes eines reduzierten und alkylierten 7S-gamma-Globulins sei aus der Literatur zusammenfassend zitiert:

Gemäß der Nomenklatur von EDELMAN G. M. und BENACERRAF B. (25) entsprechen die Banden d und e den sog. H (heavy) chains und Band f den sog. L (light) chains des menschlichen gamma-Globulins. Mit Hilfe der Ouchterlony-Technik und der Methode der Harnstoff-Stärkegel-Immunoelktrophorese vermochte POULIK M. D. (115), diese L und H Ketten mit den S- und F-Determinanten der gamma-Globulin-Fragmente nach Papain-Digestion (106) zu identifizieren. Demnach sind Band d und e Determinanten des F-Fragmentes, Band f Determinanten des S-Fragmentes; in dem Bereich der L-Ketten wandert maskiert zusätzlich eine sich schnell bewegende Unter-einheit der F-Determinanten. Ähnlich wie die H- und L-Ketten verhalten sich in der S.G.E. die mit Sephadex chromatographisch isolierten Dissoziationsprodukte eines 7S gamma-Globulins (23, 37), die 4 Polypeptidketten 2A + 2B. FLEISCHMAN J. B. et al. (37) und entsprechend EDELMAN G. M. und POULIK M. D. (23) lokalisieren die höhermolekularen A-Ketten ( $M_{app} = 50\ 000$ ) im Bereich d und e, die nieder-molekularen B-Ketten ( $M_{app} = 20\ 000$ ) im Bereich f.

## 9. Darstellung der Dissoziationsprodukte von vier isolierten

### $\gamma_M$ -Globulin-Komplexen

Das Versuchsergebnis in Abb. 34, Fig. 27, zeigt in Gegenüberstellung das Elektropherogramm von Proteinuntereinheiten eines normalen  $\gamma_G$ -Globulins Ba. HJ. und der  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe von 4 Patienten mit Morbus Waldenström, Sp. Ch., P. G., Ma. P., Di. O.; die Aufarbeitung des Materials erfolgte jeweils wie in Teil III B beschrieben.

Zunächst fällt in Abb. 34, Fig. 27 auf, daß die Makroglobuline im dissoziierten Zustand, im Gegensatz zu den nativen  $\gamma_M$ -Globulinen (Abb. 32) ein Proteinspektrum im Gel ergeben.

Beim Vergleich der Proteinmuster der  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe miteinander ist eine grobe Ähnlichkeit feststellbar. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Zone 3, 5 und 6; die Elektropherogramme stimmen in der Lokalisation dieser Zonen etwa überein, variieren jedoch in deren Intensität, selbst wenn man den höheren Prozentgehalt der Ausgangslösung von Sp. Ch. und Di. O. mit berücksichtigt.

In Zone 1 zeigen sich bei Sp. Ch. und P. G. feine Linien, bei Ma. P. und Di. O. fehlen diese.

Zone 2 ist in allen 4 Fällen vorhanden, bei Ma. P. nur angedeutet.

Zone 3 können wiederum alle vier Proteinlösungen aufweisen.

Zone 4 fehlt lediglich bei P. G.

Zone 5 ist bei Sp. Ch., P. G. und Ma. P. angegeben.

Zone 6 ist bei Sp. Ch. und Di. O. stark ausgeprägt, bei Ma. P. nur angedeutet und fehlt bei P. G. völlig.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der vier  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe mit dem des  $\gamma_G$ -Globulins Ba. HJ. kann eine geringe Übereinstimmung von Proteinzonen festgestellt werden.

Band c und Zone 3, sowie Band d und Zone 4 weisen gleiche Lokalisation auf; die Lokalisation von Band f ist jener von Zone 5 und 6 ähnlich. Kathodisch von Band f weisen auch die Proteinmuster Sp. Ch. bis Di. O. keine Zone mehr auf.

Im Proteinmuster der  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe fehlt völlig ein Gegenstück zu Band e des  $\gamma_G$ -Globulins.

Diese Versuchsergebnisse bestätigen Beschreibungen von POULIK M. D. und SMITHIES O. (117), ISLIKER H. (61), SCHEURLIN P. G. (134) und TISCHENDORF (153), daß  $\gamma_M$ -Globuline, die im Nativzustand wegen ihrer spezifischen Molekülgröße und Form (36, 140, 35, 28) in das Netzwerk des Stärkegels nicht eindringen können, im depolymerisierten Zustand

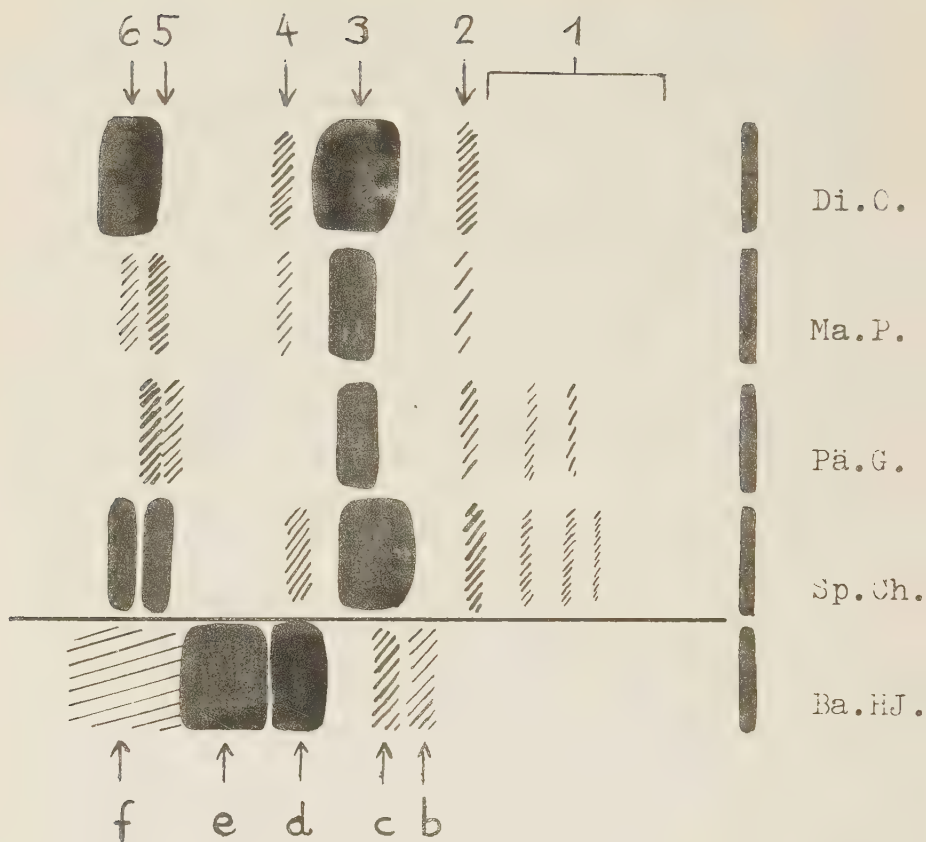


Fig. 27: Dissoziationsprodukte von 4  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexen, Sp.Ch., Pä.G., Ma.P., Di.O., und 1 normalen  $\gamma_G$ -Globulin Ba.HJ.

eine erhöhte Diffusionsfähigkeit besitzen und in das Gel einwandern, erst dadurch ist eine Selektivierung und Charakterisierung der erhaltenen Proteinuntereinheiten nach spezifischer Ladung, Form und Größe im Stärkegel ermöglicht. - Es kann jedoch sein, daß trotz der Vorbehandlung inerte Komponenten im Depotgraben liegen geblieben sind.

Aus dem Versuchsergebnis in Abb. 34, Fig. 27 kann ferner geschlossen werden, daß die Dissoziationsprodukte der Makroglobulinkomponenten in den hier analysierten Fällen stärke-gelelektrophoretisch heterogenen Charakter besitzen. Gleiche Ergebnisse sind zu finden bei EDELMAN G.M. und POULIK M.D. (23), SCHEURLIN et al. (134) und REISNER C. et al. (122).

Laut Angaben zahlreicher Autoren, dissoziieren alle  $\gamma^M$ -Globuline mit den Sedimentationsgrößen  $S_{20} = 19S, 27 - 35S, 35 - 45S$  zu 6-7S Einheiten (153, 19, 18, 47, 57, 59, 62, 122, 138, 61). Viskositätsprüfungen führten zu entsprechenden Ergebnissen: durch Annäherung an die Kugelgestalt zeigen die Depolymerisationsprodukte eine einheitliche Viskosität, entsprechend jener von 6S-Einheiten (61, 153). Papiearelektrophoretisch ist lediglich eine Verbreiterung des abnormen Gradienten in einigen Fällen bemerkt worden, und ist kein Hinweis auf eine Heterogenität gegeben (134). Chromatographisch konnte REISNER C. und FRANKLIN E. (122) eine Subfraktionierung in 3 Einheiten aufweisen; diese unterschieden sich voneinander durch ihr papiearelektrophoretisches Verhalten und ihren Hexosegehalt, waren immunologisch jedoch identisch.

Erst in der S.G.E. kommt durch den Effekt der Selektivierung von Proteinuntereinheiten nach Ladung, sowie Form und Größe die Heterogenität der Dissoziationsprodukte deutlich zur Darstellung.

Das Elektropherogramm der artifiziell erhaltenen Makroglobulin-Subfraktionen im Stärkegel läßt zunächst Gemeinsamkeiten erkennen; es ist jedoch gleichzeitig deutlich zu sehen, daß eine volle Identität der 4 Proteinspektren Sp. Ch., Pä.G., Ma.P., Di.O. nicht vorliegt. Offensichtlich ist die Heterogenität der Dissoziationsprodukte von individualspezifischem Charakter.

Teilweise ist eine Identifizierung der Proteinzonen der  $\gamma^M$ - und  $\gamma^G$ -Globulin-Untereinheiten in ihrer Lokalisation möglich; dennoch ist ersichtlich, daß die Proteine der Makroglobuline durch Reduktion und Alkylierung nicht zu denselben Einheiten depolymerisiert werden wie das normale 7S  $\gamma$ -Globulin unter den gleichen Bedingungen. Sie können somit nicht als Polymere des 7S  $\gamma$ -Globulins betrachtet werden.

Diese Feststellung entspricht Ergebnissen anderer Untersuchungsverfahren zum Studium der Dissoziationsprodukte von gamma-Globulinen. Es sei hier insbesondere auf sedimentatorische und immunologische Untersuchungsergebnisse

hingewiesen. Nach EDELMAN G. M. (22), EDELMAN G. M. und POULIK M. D. (79) und FLEISCHMAN J. B., PAIN R. H., PORTER R. R. (37) depolymerisiert 7S  $\gamma$ -Globulin zu 2-3S Einheiten;  $\gamma_M$ -Globuline dagegen dissoziieren zu 6-7 S Einheiten. Antigenitätsbestimmungen zeigen eine teilweise Antigenidentität der Dissoziationsprodukte von  $\gamma_M$ -Globulinen mit 7S gamma-Globulinen, gleichzeitig aber ein Fehlen von spezifischen Antigenen Gruppen (122, 74, 43, 61).

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Die wichtigsten theoretischen Grundlagen der Elektrophorese im Stärkegel wurden aufgezeigt, unter besonderer Berücksichtigung der spezifischen Eigenschaften des Trägermaterials.

Man kann sagen, daß das Verfahren der S. G. E. zur Analyse von Serumproteinen der Möglichkeit der Selektivierung einzelner Komponenten nach dem Gesichtspunkt der spezifischen Nettoladung und zugleich der spezifischen Molekülgröße und -Form augenblicklich optimal gerecht wird.

2. Weiterhin wurde die Möglichkeit der Subfraktionierung von Proteinen durch Dissoziierung mit Harnstoff, Reduktion, insbes. mit Merkaptanen, und anschließender Alkylierung mit  $\alpha$ -Hálogen-Fettsäuren theoretisch abgehandelt.

3. Die Ausarbeitung der Methode der S. G. E. erfolgte in Anlehnung an die Originalmethode von SMITHIES O.; in Anpassung an die zur Verfügung stehenden Versuchsbedingungen wurden zahlreiche Abänderungen getroffen.

Die Art der Einbringung des Untersuchungsmaterials in das Gel - in Form eines Serum-Gel-Gemisches - wurde besonders hervorgehoben, und der Vorzug dieses Verfahrens im Vergleich mit anderen Möglichkeiten diskutiert.

4. Zur Darstellung von Proteinuntereinheiten wurde außerdem die Methode der Elektrophorese im harnstoffhaltigen Gel, im wesentlichen nach Angaben von POULIK M. D., ausgearbeitet.

5. Die Aufarbeitung des zu untersuchenden Proteins mit Harnstoff, 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid wurde genau beschrieben. Sie ist zur Untersuchung von nur geringen Mengen an Untersuchungsmaterial geeignet.

6. Die elektrophoretische Auftrennung von 4 Normalseren bestätigte die Angaben der einschlägigen Literatur, daß lediglich kathodisch der Startstelle die gamma-Globuline deutlich zur Darstellung kommen; diese Proteinzone war jeweils homogen.

Eine isolierte  $\gamma_G$ -Fraktion eines Normalserums zeigte neben der Ausbreitung im kathodischen Bereich zugleich eine Wanderung zur Anode;

daß es sich bei der anodisch sowie kathodisch ausgerichteten Proteinzone ausschließlich um  $\gamma_G$ -Globuline handelte, konnte aus Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge und Immunoelktrophorese entnommen werden.

7. Bei der Darstellung von vier  $\gamma_G$ -Plamocytom-Seren waren die abnormen Proteinkomponenten in einem Bereich von slow  $\alpha$  bis kathodisch der normalen  $\gamma$ -Globulinzone in verschiedener Lagebeziehung zur Startstelle lokalisiert.

Die isolierten abnormen  $\gamma_G$ -Komponenten zeigten teilweise eine Lokalisierung außerhalb des normalen  $\gamma$ -Globulins und wiesen in 3 Fällen eine Heterogenität, in 1 Fall eine  $\gamma_G$  Homogenität, auf.

Bei der Darstellung der Vollseren war in 2 Fällen in der Postalbumin-Zone eine zusätzliche Linie zu erkennen; wahrscheinlich handelte es sich jeweils um ein  $\gamma_M$ -Globulin.

Als Nebenbefund konnte in allen 4 Fällen bei der Immunoelktrophorese und der S. G. E. eine Übereinstimmung in der Ausrichtung der abnormen Komponenten zu den elektrischen Polen festgestellt werden.

8. Für Vergleichszwecke wurden 3 Seren von Patienten mit  $\gamma_A$ -Plasmocytom in der S. G. E. aufgetrennt. Alle 3 Fälle zeigten deutlich eine Heterogenität der abnormen Proteinanteile; der Lokalisationsbereich im Proteinspektrum lag zwischen Transferrin und der Startstelle.

9. Das Elektrophoerogramm von 4 Seren von Patienten mit Morbus Waldenström zeigte außer einigen quantitativen Verschiebungen keine Abnormitäten.

Entsprechend zahlreichen Angaben der einschlägigen Literatur konnte anhand der aus den Patientenseren isolierten gamma-Makroglobulinanteile aufgezeigt werden, daß die  $\gamma_M$ -Globuline bei der S. G. E. an der Startstelle liegen bleiben. Lediglich in einem Fall konnte man aus dem Proteinspektrum des Vollserums evtl. entnehmen, daß eine bestimmte Makroglobulineinheit in das Gel eingedrungen war.

10. Eine normale  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion wurde durch Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercaptoethanol und Jodacetamid dissoziiert; die einzelnen Stufen dieses Arbeitsganges wurden stärkegelelektrophoretisch erfaßt und die jeweiligen Ergebnisse diskutiert.

Schon unter der Einwirkung von Harnstoff erfolgte eine wesentliche Molekülzerkleinerung. Nach zusätzlicher Reduzierung und Alkylierung waren 5 Proteinbanden ausgebildet. Bei Unterlassung des Alkylierungsprozesses hatte sich unmittelbar kathodisch der Auftragstelle das

diffuses Band lokalisiert.

Die Ergebnisse stimmten im Wesentlichen mit entsprechenden Berichten anderer Verfasser überein.

11. Die Dissoziationsprodukte von  $\gamma_M$ -Globulinkomplexen von 4 Patienten mit Morbus Waldenström wurden stärkegelelektrophoretisch geprüft. Erst im depolymerisierten Zustand vermochten die Globuline in das Gel einzudringen. Die Spaltprodukte verhielten sich in der S. G. E. heterogen. Der Vergleich der vier Elektropherogramme untereinander wies auf einige Gemeinsamkeiten hin, ließ jedoch zugleich eine Individualspezifität der Dissoziationsprodukte vermuten.

Eine Identifizierung der Proteinazonen der  $\gamma_M$ - mit  $\gamma_G$ -Globulin-Untereinheiten war nur teilweise möglich; es wurde deutlich, daß die Proteine der Makroglobulinkomplexe durch Reduktion und Alkylierung nicht zu denselben Einheiten depolymerisierten wie das normale  $\gamma_G$ -Globulin unter den gleichen Bedingungen.

## A B B I L D U N G S V E R Z E I C H N I S

- Abb. 1      Papierelektrophorese; normales Vollserum Ba. HJ. und daraus isolierte  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba.HJ.
- Abb. 2      Immunoelktrophorese:  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ. und Normalserum Ba. HJ. im Ansatz gegen Anti-Humanserum vom Kaninchen.
- Abb. 3      Ergebnis der Ultrazentrifuge:  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.
- Abb. 4      Immunoelktrophorese; Normalserum Ba. HJ. und  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ., angesetzt gegen Anti- $\gamma_G$  vom Kaninchen.
- Abb. 5      Immunoelktrophorese; Normalserum Ba. HJ. und  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ., angesetzt gegen Anti- $\gamma_A$  von der Ziege.
- Abb. 6      Immunoelktrophorese; Normalserum Ba. HJ. und  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ., angesetzt gegen Anti- $\gamma_M$  vom Pferd.
- Abb. 7-10    Immunoelktrophorese; Patientenserum (  $\gamma_G$ -Plasmocytom) und daraus isolierte pathologische  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion, angesetzt gegen Anti-Human-Serum.
- Abb. 7      Patient Ma. B.
- Abb. 8      Patient Ba. J.
- Abb. 9      Patient Zo. K.
- Abb. 10     Patient Bü. M.
- Abb. 11-14    Papierelektrophorese; Patientenserum (Morbus Waldenström) und daraus isolierter  $\gamma_M$ -Globulin-Komplex.
- Abb. 11     Patient Pā. G.
- Abb. 12     Patient Sp. Ch.
- Abb. 13     Patient Ma. P.
- Abb. 14     Patient Di. O.

- Abb. 15-18     Immunelektrophorese: Patientenserum (Morbus Waldenström) und daraus isolierter  $\gamma_M$ -Globulin-Komplex, ange-  
setzt gegen Anti-Humanserum vom Pferd.
- Abb. 15     Patient Sp. Ch.  
Abb. 16     Patient P. G.  
Abb. 17     Patient Ma. P.  
Abb. 18     Patient Di. O.
- Abb. 19-22     Ergebnis der Ultrazentrifuge: aus Patientenserum (Morbus Waldenström) isolierter  $\gamma_M$ -Globulin-Komplex.
- Abb. 19     Patient Sp. Ch.  
Abb. 20     Patient P. G.  
Abb. 21     Patient Ma. P.  
Abb. 22     Patient Di. O.
- Abb. 23     S. G. E. eines Normalserums;   
Elektrophoresebedingungen: 5V/cm im Gel, 14 Std.
- Abb. 24     S. G. E. eines Normalserums;  
Elektrophoresebedingungen: 5,5V/cm im Gel, 15 Std.
- Abb. 25     S. G. E. - Ergebnis nach Einfüllen des unveränderten Serums (a) bzw. eines Serum-Gel-Gemisches (b) in den Depotsplatt.
- Abb. 26     S. G. E. - 4 Normalseren, Ba. HJ., N. N. a, b, c;
- Abb. 27     S. G. E. - 1  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.;  
a = 0,75 g% Proteingehalt; b = 0,50 g% Proteingehalt.
- Abb. 28     S. G. E. - 4  $\gamma_G$ -Plasmocytom-Vollseren Bü. M., Bl. J., Zo. J., Ma. B.;
- Abb. 29     S. G. E. - aus Vollseren (  $\gamma_G$ -Plasmocytom) isolierte pathologische  $\gamma_G$ -Globuline; Bü. M., Bl. J., Zo. K., Ma. B.; 1 normales  $\gamma_G$ -Globuline Ba. HJ.;  
1 Normalserum Ba. HJ.;
- Abb. 30     S. G. E. - 2  $\gamma_A$ -Plasmocytom-Vollseren Ka. N., Ei. S.,  
1 Normalserum Ba. HJ.;

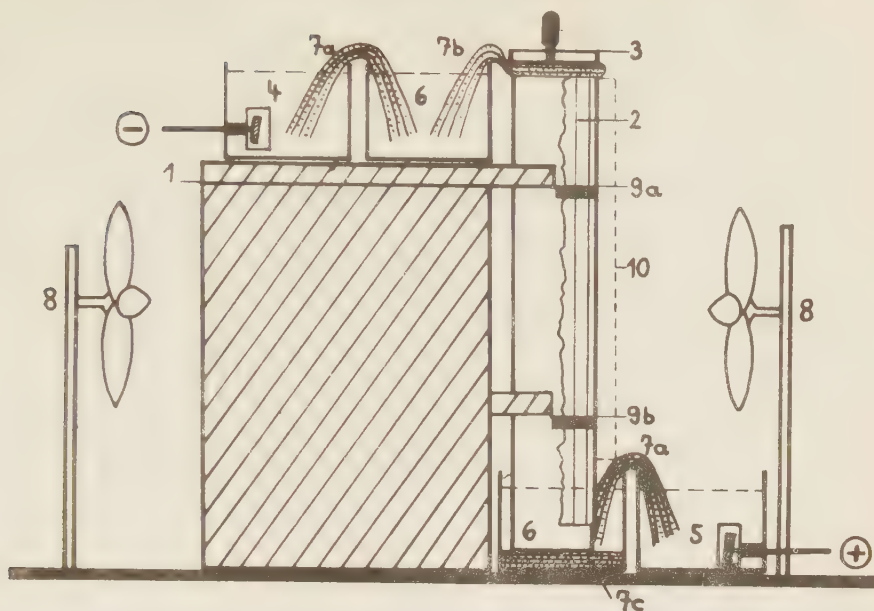
- Abb. 31 S.G.E. - 4 Patientenseren (Morbus Waldenström), Sp. Ch.,  
Pä.G., Ma.P., Di. O.; 1 Normalserum Ba. HJ.;
- Abb. 32 S.G.E. - 4 isolierte  $\gamma^M$ -Globulin-Komplexe, Sp. Ch.,  
Pä. G., Ma. P., Di. O.; 1  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.  
und 1 Normalserum Ba. HJ.;
- Abb. 33 S.G.E. - Dissoziation eines  $\gamma_G$ -Globulins Ba. HJ.  
Schritt 1: Inkubation mit Harnstoff,  
Schritt 2: Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercaptoaethanol,  
Schritt 3: Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercaptoaethanol  
und Jodacetamid;
- Abb. 34 S.G.E. - Dissoziation von 4  $\gamma^M$ -Globulin-Komplexen  
aus Patientenseren bei Morbus Waldenström, Sp. Ch.,  
Pä.G., Ma.P., Di.O. und 1 normalen  $\gamma_G$ -Globulin-  
Fraktion Ba. HJ.;

# FIGURENVERZEICHNIS

|          |                                                                                               | Seite |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Fig. 1   | Schema der Elektrophorese (aus Karlson, Lehrbuch der Biochemie)                               | 7     |
| Fig. 2   | Modell zur Darstellung der elektrophoretischen Doppelschichten                                | 10    |
| Fig. 3 a | Adsorption der Serumproteine am Papier                                                        | 12    |
| Fig. 3 b | Adsorption der Serumproteine am Stärkegel                                                     | 13    |
| Fig. 3 c | Adsorption der Serumproteine am Agargel<br>(Fig. 3 a, b, c aus SCHEURLÉN P. G., 54)           | 13    |
| Fig. 4   | Elektrophoretische Wanderung der Serumproteine in verschiedenen Medien                        | 14    |
| a        | freie Elektrophorese (TISELIUS A., 100)                                                       | 14    |
| b        | Zonenelektrophorese auf Träger<br>(TISELIUS A., 100, HANNIG K., 89)                           | 14    |
| c        | Zonenelektrophorese im Gel als Träger<br>(BEHRING-Sonderdruck, 38)                            | 15    |
| Fig. 5   | Relation "Wanderungsstrecke der Proteine - Stärkekonzentration im Gel"<br>(SMITHIES O., 109)  | 17    |
| Fig. 6   | Relation "Proteingröße-Stärkekonzentration im Gel" (SMITHIES O., 109)                         | 18    |
| Fig. 7   | Retardation, "eine Funktion der Größendifferenz" (SMITHIES O., 109)                           | 19    |
| Fig. 8   | Einfluß der Elektroosmose in Abhängigkeit von der apparativen Anordnung;<br>(BLOEMDAL H., 18) | 21    |
| Fig. 9   | Wasserstoffbindungen zwischen 2 Peptidketten                                                  | 23    |
| Fig. 10  | Wirkung von Harnstoff auf die C=O . . . . und HN-C . . . . -Bindungen                         | 23    |
| Fig. 11  | Maße der Filgerpapier-Brücken                                                                 | 29    |

|         |                                                                                                                                                                |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 12 | Viskositätsveränderungen während der Gelzubereitung; (SMITHIES O., 8)                                                                                          | 31 |
| Fig. 13 | Paraffinüberzug des Geltroges                                                                                                                                  | 35 |
| Fig. 14 | Versuchsanordnung                                                                                                                                              | 81 |
| Fig. 15 | S. G. E. eines Normalserums                                                                                                                                    | 48 |
| Fig. 16 | Schema der Proteinbanden eines Normalserums nach Elektrophorese im Stärkegel.                                                                                  | 50 |
| Fig. 17 | 3 Typen der Hauptglobingruppen bei der S. G. E.                                                                                                                | 51 |
| Fig. 18 | im Depotspalt: a. unverändertes Serum<br>b. Serum-Gel-Gemisch                                                                                                  | 52 |
| Fig. 19 | Auftrennung von 4 Normalseren im Stärkegel, Ba. HJ., N. N. a, b, c;                                                                                            | 53 |
| Fig. 20 | S. G. E.: $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.                                                                                                                | 54 |
| Fig. 21 | S. G. E.: 4 $\gamma_G$ -Plasmocytom-Seren<br>Ma. B., Zo. K., Bl. J., Bü. M.;<br>1 Normalserum Ba. HJ.                                                          | 56 |
| Fig. 22 | S. G. E.: 4 $\gamma_G$ -Plasmocytom-Globuline<br>Ma. B., Zo. K., Bl. J., Bü. M.;<br>1 normales $\gamma_G$ -Globuline Ba. HJ.;<br>1 normales Vollserum Ba. HJ.; | 57 |
| Fig. 23 | S. G. E.: 2 $\gamma_A$ -Myelom-Vollseren<br>Ka. N., Ei. S., 1 Normalserum Ba. HJ.;                                                                             | 60 |
| Fig. 24 | S. G. E.: 4 Patientenseren bei Morbus Waldenström; Sp. Ch., P. G., Ma. P., Di. O.; 1 Normalserum Ba. HJ.;                                                      | 62 |
| Fig. 25 | Lokalisation der gamma-Globulin-Anteile                                                                                                                        | 64 |
| Fig. 26 | S. G. E.: Stufen der Materialaufarbeitung eines normalen $\gamma_G$ -Globulins Ba. HJ.;                                                                        | 66 |
| Fig. 27 | S. G. E.: Dissoziationsprodukte von 4 $\gamma^M$ -Globulin-Komplexen, Sp. Ch., P. G., Ma. P., Di. O.; und 1 normalen $\gamma_G$ -Globulin Ba. HJ.;             | 70 |

Fig. 14 VERSUCHSANORDNUNG  
während der Elektrophorese



schematische Darstellung

- 1 Ständer
- 2 Gelkammer, mit Paraffinschicht überzogen
- 3 angeschraubte Querwand der Kammer
- 4 Kathodenschale mit Kaliumchlorid-Lösung
- 5 Anodenschale mit Ammoniumsulfat-Lösung
- 6 Wannepuffer
- 7 Filterpapierbrücken
  - a - b - c - (siehe "Geräte")
- 8 Ventilatoren
- 9 Depot für das Untersuchungsmaterial
  - a) bei der einfachen S. G. E.
  - b) bei Untersuchungen von red. und alkyl.  $\gamma$ -Globulinen in Harnstoffgel
- 10 Meßstrecke für die Kontrolle der Spannungsverhältnisse im Gel während der Elektrophorese
  - bei Kammer 1 = 27 cm
  - bei Kammer 2 = 22 cm



TABELLE

|                      |            | Sp. Ch.        | Pä. G.           | Ma. P.           | Di. O.           |
|----------------------|------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| PAPIERELEKTROPHORESE | M-Grad.    | -              | -                | 41,1             | -                |
|                      | $\gamma$   | 41,0           | 33,7             | 11,9             | 42,5             |
|                      | $\beta$    | 7,0            | 10,3             | 6,0              | 8,5              |
|                      | $\alpha_2$ | 9,5            | 12,5             | 5,0              | 13,2             |
|                      | $\alpha_1$ | 7,0            | 7,7              | 6,2              | 3,8              |
|                      | Alb        | 35,5           | 35,8             | 29,8             | 32,0             |
|                      | GES. EIW.  | 9,3            | 12,0             | 11,2             | 9,5              |
|                      |            | rel. %         |                  |                  |                  |
| ULTRAZENTRIFUGE      | VOLLSERUM  | g %            |                  |                  |                  |
|                      |            | M              | 32,1 S<br>3,2 %  | 29,8 S<br>2,3 %  | -<br>2,6 %       |
|                      |            | M              | 24,9 S<br>5,9 %  | 23,4 S<br>6,2 %  | 28,8 S<br>1,6 %  |
|                      |            | M              | 16,8 S<br>31,3 % | 16,3 S<br>42,3 % | 16,1 S<br>44,6 % |
|                      |            | A              | 44,4 S<br>51,6 % | 4,3 S<br>36,7 %  | 18,9 S<br>17,9 % |
|                      |            | G <sub>1</sub> | 6,0 S<br>8,0 %   | 6,6 S<br>12,5 %  | 4,2 S<br>43,9 %  |
|                      |            | M <sub>3</sub> | 32,4 S<br>9,2 %  | -<br>10,7 %      | 34,6 S<br>6,9 %  |
|                      |            | M <sub>2</sub> | 24,7 S<br>17,3 % | 26,3 S<br>19,2 % | 34,2 S<br>4,8 %  |
|                      | FRAKTION   | M <sub>1</sub> | 17,0 S<br>5,6 %  | 17,4 S<br>70,1 % | 26,7 S<br>14,0 % |
|                      |            |                |                  | 18,0 S<br>77,2 % | 18,1 S<br>1,2 %  |
|                      |            |                |                  |                  |                  |



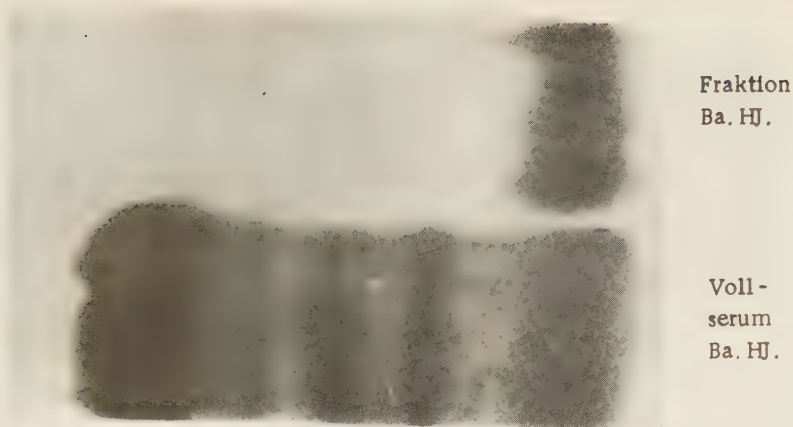


Abb. 1      Papierelektrophorese: normales Vollserum Ba. HJ.  
und daraus isolierte  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.

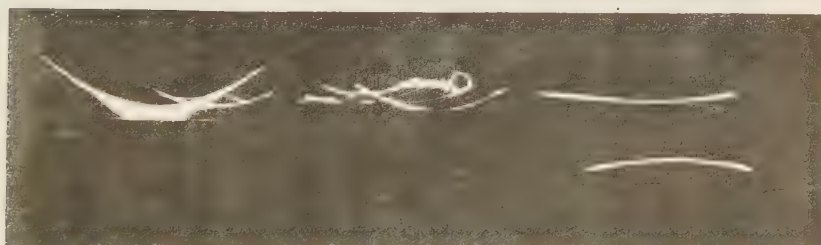


Abb. 2      Immunelektrophorese: i. d. Rinne ist Anti-Human-  
serum v. Kaninchen; oben: Vollserum Ba. HJ. ;  
unten:  $\gamma_G$ -Fraktion Ba. HJ.

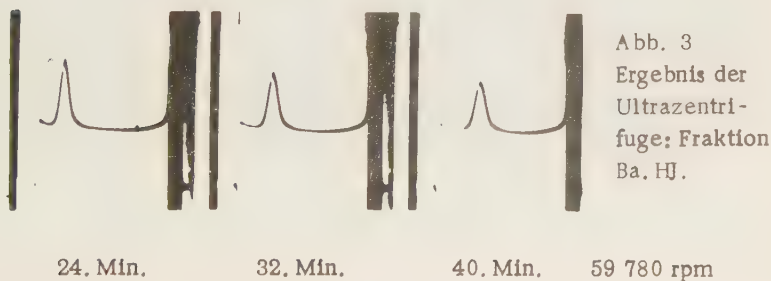


Abb. 3  
Ergebnis der  
Ultrazentri-  
fuge: Fraktion  
Ba. HJ.



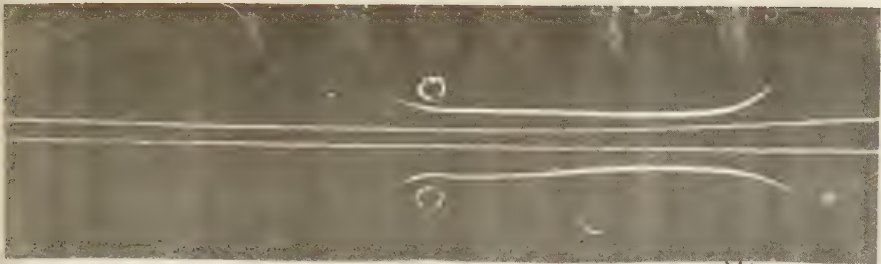


Abb. 4 Immunoelektrophorese: i. d. Rinne ist Anti- $\gamma_G$  von Kaninchen; oben: Normalserum Ba. HJ.; unten: isolierte  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.;

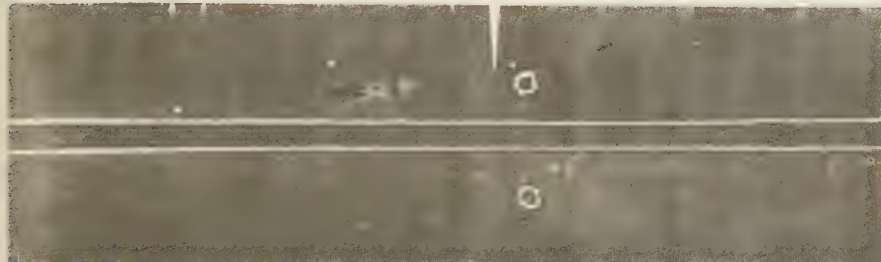


Abb. 5 Immunoelektrophorese: i. d. Rinne ist Anti- $\gamma_A$  v. d. Ziege; oben: Normalserum Ba. HJ.; unten:  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.;

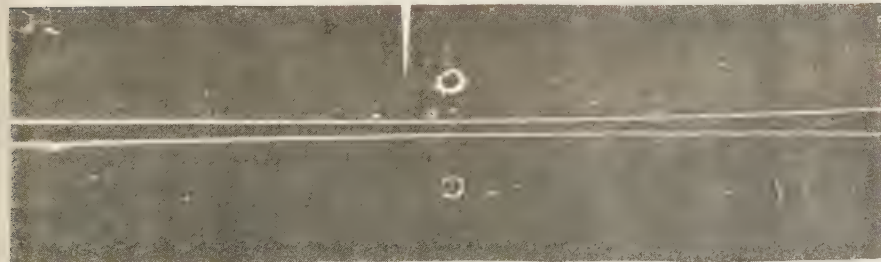


Abb. 6 Immunoelektrophorese: i. d. Rinne ist Anti- $\gamma_M$  v. Pferd; oben: Normalserum Ba. HJ.; unten:  $\gamma_G$ -Globulin-Fraktion Ba. HJ.;



Abb. 7 bis 10 Immunelektrophorese; i. d. Rinne ist  
 Anti-Humanserum v. Kaninchen;  
 oben: Patienten-Vollserum;  
 unten: pathol.  $\gamma$ -Globulin-Fraktion;



Abb. 7 Patient Ma. B.

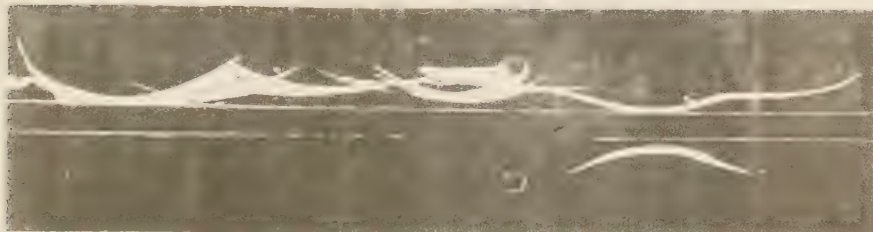


Abb. 8 Patient Ba. J.

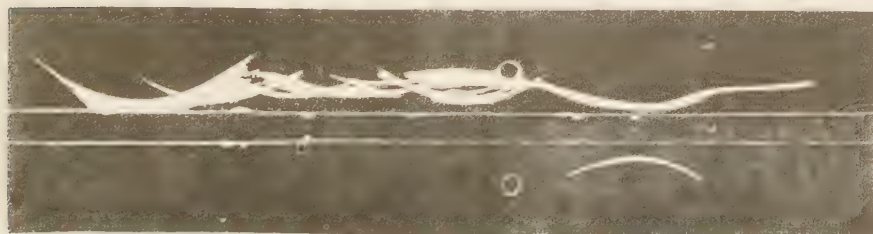


Abb. 9 Patient Zo. K.



Abb. 10 Patient Bl. M.



Abb. 11 und 12      Papierelektrophorese (Patienten mit M. W.)

Abb. 11      oben: Patienten-Vollserum PÄ. G. ;  
                  unten: isolierter Makroglobulin-Komplex PÄ. G. ;

Abb. 12      oben: Patienten-Vollserum Sp. Ch. ;  
                  unten: isolierter Makroglobulin-Komplex Sp. Ch. ;



Abb. 11



Abb. 12



Abb. 13 und 14      Papierelektrophorese (Patienten mit M. W.)

Abb. 13      oben; Patienten-Vollserum Ma. P. ;  
                  unten; isolierter  $\gamma_M$ -Globulin-Komplex Ma. P. ;

Abb. 14      oben; Patienten-Vollserum Di. O. ;  
                  unten; isolierter  $\gamma_M$ -Globulin-Komplex Di. O. ;



Abb. 13



Abb. 14



Abb. 15 bis 18

Immunoelktrophorese (Patienten mit M. W.)  
i. d. Rinne: Anti-Humanserum v. Pferd  
oben: Patienten-Vollserum  
unten: isolierter  $\gamma$ -Globulin-Komplex



Abb. 15 Patient Sp. Ch.



Abb. 16 Patient Pā. G.



Abb. 17 Patient Ma. P.

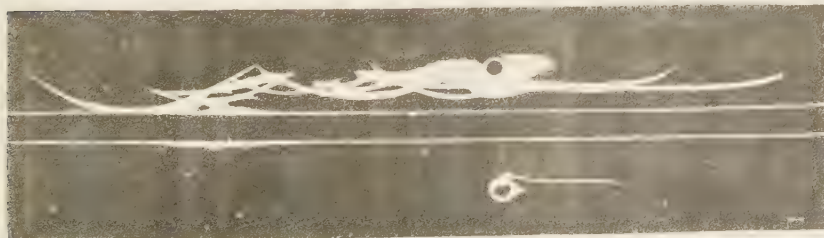


Abb. 18 Patient Di. O.



Abb. 19 bis 22

Ergebnisse der Ultrazentrifuge: 59 780 rpm

Aus Patientenserum (M. W.) isolierte

$\gamma$ <sub>M</sub>-Globulin-Komplexe.

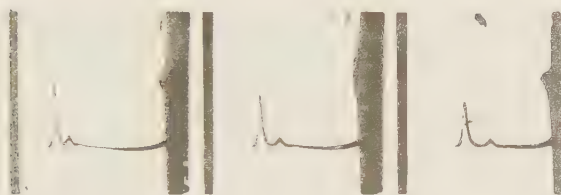


11. Min.

15. Min.

19. Min.

Abb. 19  
Fraktion  
Sp. Ch.

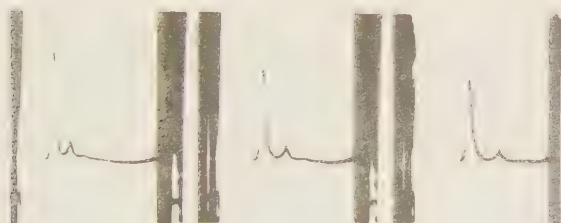


9. Min.

13. Min.

17. Min.

Abb. 20  
Fraktion  
Pä. G.



18. Min.

22. Min.

26. Min.

Abb. 21  
Fraktion  
Ma. P.



13. Min.

17. Min.

21. Min.

Abb. 22  
Fraktion  
Ol. C



Abb. 23 S. G. E. eines Normalserums  
Elektrophorese-Bedingungen: 5 V/cm im Gel; 14 Std.



Abb. 24 S. G. E. eines Normalserums  
Elektrophorese-Bedingungen: 5,5 V/cm im Gel; 15 Std.

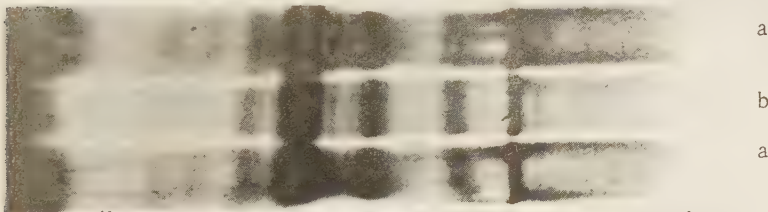


Abb. 25 S. G. E. - Ergebnis nach Einfüllen des unveränderten Serum (a), bzw. eines Serum-Gel-Gemisches (b) in den Depotsplatt.

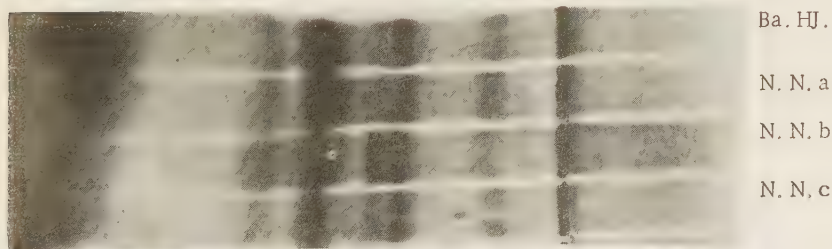


Abb. 26 S. G. E. - 4 normale Vollseren  
Ba. HJ., N. N. a, b, c;

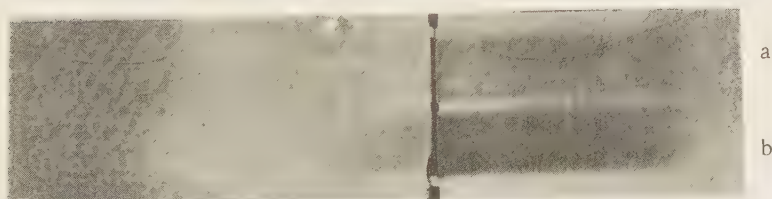


Abb. 27 S. G. E. -  $\gamma$ -Globulin Ba. HJ.  
a = 0,75 g% Proteingehalt; b = 0,50 g% Proteingehalt;



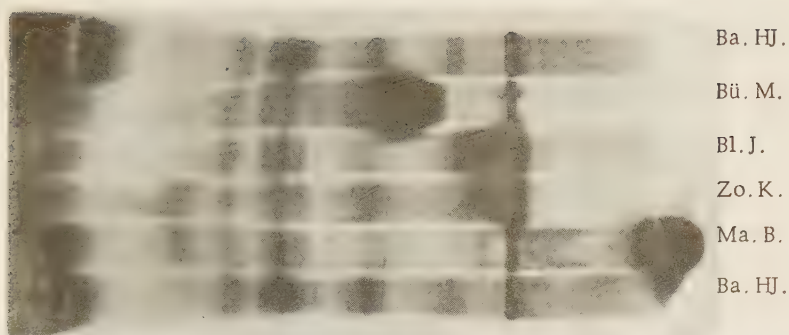


Abb. 28 S. G. E. - 4  $\gamma$ <sub>G</sub>-Plasmocytom-Vollseren, Ma. B., Zo. K., Bl. J., Bü. M.; 1 normales Vollserum Ba. HJ.

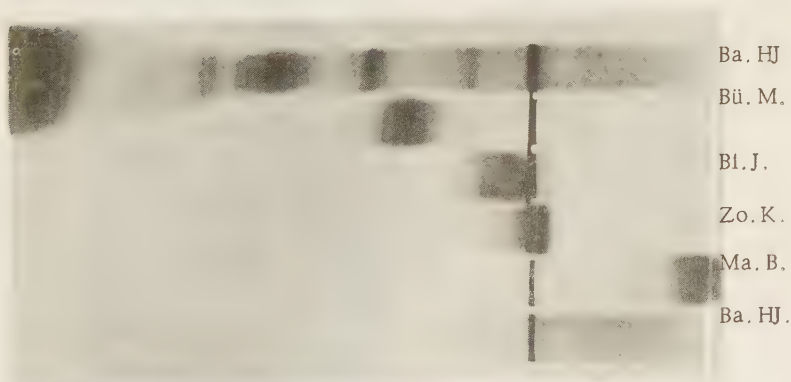


Abb. 29 S. G. E. - aus Vollseren isolierte pathologische  $\gamma$ <sub>G</sub>-Globuline Ma. B., Zo. K., Bl. J., Bü. M., 1 normales Vollserum Ba. HJ., 1 normale  $\gamma$ <sub>G</sub>-Globulin-Fraktion Ba. HJ.;



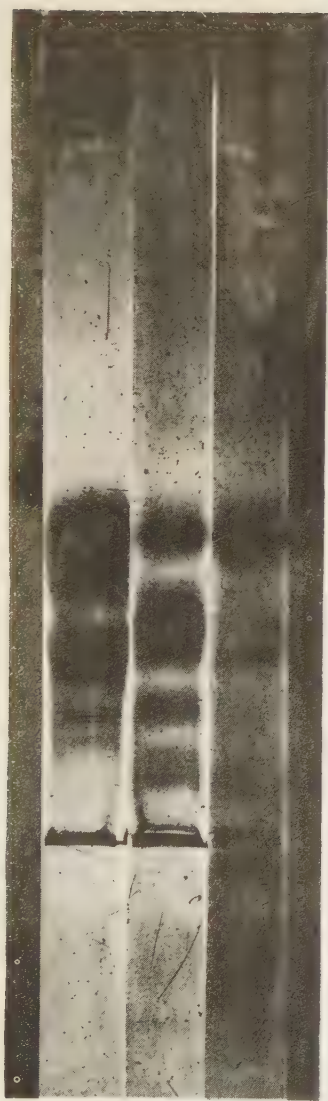


Abb. 30

S.G.E. - 2  $\gamma$ -Plasmocytom-  
Vollseren Ka. N., Eis. S. ;  
1 Normalserum Ba. HJ.

Ka. N. ; Ei. S. ; Ba. HJ.



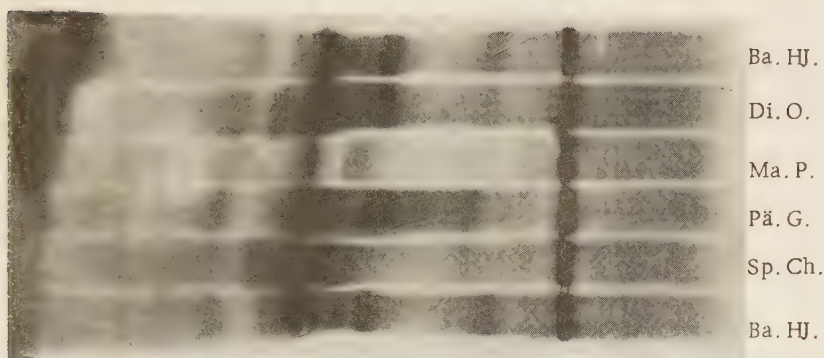


Abb. 31 S.G.E. - 4 Patientenseren bei Morbus Waldenström Sp. Ch. , P.ä. G. , Ma. P. , Di. O. ,  
1 Normalserum Ba. HJ.



Abb. 32 S.G.E. - 4 isolierte  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexe,  
Sp. Ch. , P.ä. G. , Ma. P. , Di. O. , 1 Normal-  
serum Ba. HJ. , 1 normale  $\gamma_G$ -Globulin-  
Fraktion Ba. HJ.



Abb. 33 S. G. E. - Dissoziierung eines  $\gamma_G$ -Globulins Ba. HJ.

Schritt 1: Inkubation mit Harnstoff,

Schritt 2: Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercapto-  
aethanol,

Schritt 3: Inkubation mit Harnstoff, 2-Mercapto-  
aethanol, Jodacetamid,

3a verminderter Gehalt an 2-Mercapto-  
aethanol (0,013 M/l)

3b erhöhter Gehalt an 2-Mercaptoaethanol  
(0,034 M/l)

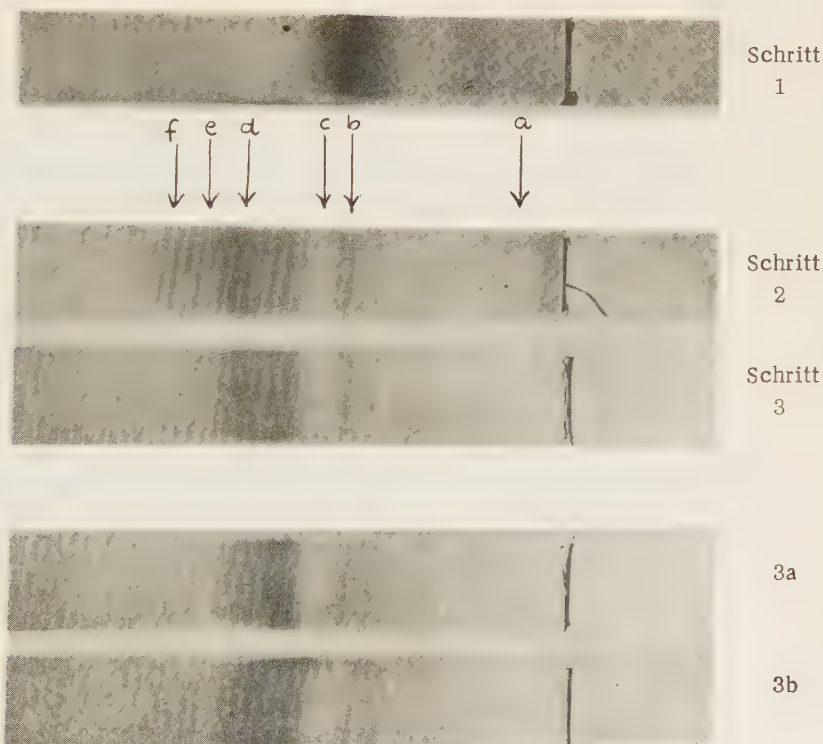
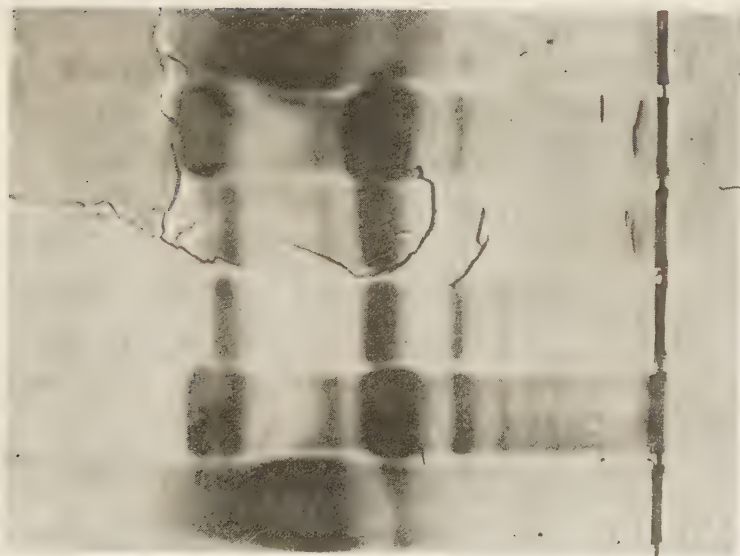




Abb. 34 S.G.E. - Dissoziation von 4  $\gamma_M$ -Globulin-Komplexen aus Patientenserum bei Morbus Waldenström, Sp.Ch., P.ä.G., Ma.P., Di.O., und 1 normalen  $\gamma_G$ -Globulin Ba.HJ.



Ba. HJ.

Di. O.

Ma. P.

P.ä. G.

Sp. Ch.

Ba. HJ.



Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Dr. H. Schwiegl für die Gewährung eines Laborplatzes an seiner Klinik und für die Übernahme des Korreferates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Herrn Priv. Doz. Dr. M. Knedel bin ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Erteilung des Referates sehr zu Dank verpflichtet.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors danke ich für ihre Anleitungen und ihre Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALLEN R.S., MURLIN J.R.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 22, 1925, 492; "Inactivation and reactivation of insulin".
- 2) ASHTON G.C.; Nature 180, 1957, 917; "Serum protein differences in cattle by S.G.E. "
- 3) BEHRINGWERK -Mitteilungen; Heft 43, 1964, 129; "Gewinnung und Eigenschaften therapeutisch wichtiger Human-Plasma-proteine".
- 4) BEHRINGWERK -Mitteilungen; Heft 43, 1964, 1; "Einige neuere analytische Methoden zur Charakterisierung der Plasma-proteine".
- 5) BENESCH R., BENESCH R.E.; Biophys. Acta, 23, 1957, 643; "Determination of sulphhydryl and disulfide groups by specific proton displacement. "
- 6) HERMES E.W. jr., Mc. DONALD H.J.; J. CROMAT. 4, 1960, 34; "A practical experimental method for converting electrophoretic mobilities in paper-stabilized media to free solution values. The isoelectric points of human serum lipoproteins. "-
- 7) BERNFIELD P., NISSELBAUM J.S.; J. Biol. Chem., 220, 1956, 851; "A modified method for protein separation by zone electrophoresis on a starch gel. "
- 8) BLOEMDAL H.; Konink. nederl. akademie van wetenschappen - Amsterdam, Proceedings, Series c 59, n 1, 1956; "Starch-gel-electrophoresis of the bovine eye lens proteins. "
- 9) BLOEMDAL H.; J. of Chromat. Vol. 2, 1959, 121; "Starch electrophoresis I. - Starch block electrophoresis. "
- 10) BLOEMDAL H.; J. Chromatogr. 3, 1960, 509; "Starch gel-electrophoresis. "

- 11) BORMAN H.G. , WESTLUND L.E. ; Arch. Biochem. Biophys. , 64, 1956, 217; "Protein chromatography on a Anion-ex-change Resin. "
- 12) BURTIN P. et al. ; Rev. franc. d'études clin. et biol. 2, 1957, 161; "Etudes immunochimiques et immuno-électrophorétiques des macroglobulinemies. "
- 13) CARBONARA A.C. , HEREMANS J.S. "Arch. Biochem. Biophys. 102, 1963, 137; "Subunits of normal and pathological  $\gamma_A$ -Globulins. "
- 14) CARLSON L.A. ; Acta Chem. scand. , 5, 1954, 510; "Electrophoretic studies of serum lipoproteins. I. A description of apparatus and technique for their separation in starch medium. "
- 15) CHAPMAN D.L. ; Phil. Mag. , 25, 1913, 475; "A contribution to the Theory of Electrocapillarity. "
- 16) CRUMPTON M.J. , WILKINSON J.K. ; Bioch. J. 88, 1963, 228; "Amino acid compositions of human and rabbit gamma-globulin and of the fragments produced by reduction. "
- 17) DEUTSCH H.F. , MORTON J.I. , KRATOCHVIL C.H. ; J. Biol. Chem. 222, 1956, 38; "Antigenic identity of hyperglobulinemic serum components with proteins of normal serum".
- 18) DEUTSCH H.F. , MORTON J.I. ; Science 125, 1957, 600; "Dissociation of human serum macroglobulin".
- 19) DEUTSCH H.F. , MORTON J.I. ; J. Biol. Chem. 231, 1958, 1107; "Human serum macroglobulin and dissociation units. I. Physicochemical properties. "
- 20) DEUTSCH H.F. , GREENWOOD F. ; Fed. Proc. 19, 1960, 344; "Molecular transformation of Macroglobulins. "
- 21) DICKENS F. Biochem. J. ; 27, 1953, 1141; "Interaction of halogenacetates and SH-compounds. "
- 22) EDELMAN G. M. ; J. Am. Chem. Soc. 81b, 1959, 3155 "Dissociation of gamma-Globulins. "
- 23) EDELMAN G.M. , POULIK M.D. ; J. exptl. Med. , 113, 1961, 861; "Studies on structural subunits of the  $\gamma$ -Globulin".

- 24) EDELMAN G.M., POULIK M.D.; Fed. Proc. 20, 1961, 387;  
"Characterisation of sub-units of the  $\gamma$ -Globulin".
- 25) EDELMAN G.M., BENACERRAF B.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.  
48, 1962, 1035; "On structural and functional relations  
between antibodies and proteins of the gamma-system."
- 26) EDSALL J.T. "Adv. in Prot. Chem., Vol. 3, 383;  
"The plasma proteins and their fractionation."
- 27) EDSTRÖM J.E.; HYDEN H. "Nature, 174, 1954, 128;  
"Ribonucleotide Analysis of individual nerve cells."
- 28) ENGLE R.L., WOODS K.R., PERT J.H.; J. Clin. Invest., 36,  
1957, 888; "Starch-gel-electrophoresis of serum  
proteins from patients with multiple myeloma".
- 29) ENGLE P.L., KENNETH M.D., WOODS K.R., et al.; Vol. 58,  
n° 1 July 1961; "Starchgel-electrophoresis of serum  
proteins and urinary proteins from patients with multiple  
myeloma, macroglobuliaemia and other forms of  
dysproteinaemia."
- 30) EVANS J.S., NELSON J.W., CORTLAND G.F.; Endocrinology,  
30, 1942, 387; "The action of cysteine and other  
reducing agents upon pregnant-mare-serum Gonadotropin".
- 31) FAHEY J.S.; J. of Clin. Investigation, Vol. 42, n° 1, 1963;  
"Heterogenity of myeloma proteins."
- 32) FIELD C.W., TEAGUE O.; J. Exptl. Med. 9, 1907, 222;  
"On the electrical charge of the native proteins and  
the agglutinin";
- 33) FINE J.M. et MORETTI J.M.; Le Pharmacien Biologiste, Tome II,  
n° 20, 345; "L'électrophorese en gel d'amidon."
- 34) FINE J.M., WASZCENKO Z., LOEB J., MOULLEC J.; Revue  
d'Hematologie, 12, n° 5, 1957, 698; "Grupes sériques  
et électrophorese sur gel d'amidon".
- 35) FINE J.M., CREYSEL R.; Nature 183, 1959, 392; "Starch gel-elec-  
trophoretiv studies on abnormal proteins in myeloma and  
macroglobulinemia."
- 36) FINE J.M., CREYSEL R., MOULLEC J.; Prot. of Biol. Fluids,  
i. Coll. 1960; "L'électrophorese en gel d'amidon. Son  
application au diagnostic biochimique des dysprotéinémis."

- 37) FLEISCHMAN J. B. , PAIN R. H. , PORTER R. R. , Arch. Biochem. Biophys. , Suppl. I. , 1962, 174; "Reduction of  $\gamma$ -Globulins. "
- 38) FLEISCHMAN J. B. , PORTER R. R. , PRESS E. M. ; Biochem. J. 88, 1963, 220; "The arrangement of the peptide chains in gamma-globulin. "
- 39) FLODIN P. , PORATH J. ; Biochem. Biophys. Acta, 13, 1954, 175; "Zone electrophoresis in starch columns. "
- 40) FLODIN P. , GELOTTE B. , PORATH J. ; Nature 188, 1960, 493; "A method for concentrating solutes of high molecular weight. "
- 41) FLYNN F. V. , STAW E. A. ; J. Clin. Path. , 11, 1958, 338; "Fractionation of Bence-Jones protein by starch-gel-electrophoresis. "
- 42) FRAENKEL CONRAT H. L. , SIMPSON M. E. , EVANS H. J. , J. Biol. Chem. 142, 1942, 107; "The effect of thiol-compounds on the activity of lactogenic hormone. "
- 43) FRANKLIN E. C. ; J. Immunol. 85, 1960, 138; "Immunologic differences between the 7 S and 19 S components of normal human  $\gamma$ -globulin; antigenic specificity of the 7 S component. "
- 44) FRANKLIN E. C. , KUNKEL H. G. ; J. Immunol. , 78, 1957, 11, "Immunologic differences between the 19 S and 7 S components of normal human  $\gamma$ -globulin. "
- 45) FRANKLIN E. C. , REISNER C. H. ; Fed. Proc. 19, 1960, 2513; "Antigenic differences between the 7 S and 19 S components of normal human  $\gamma$ -globulin and the 19 S monomers. "
- 46) FREUDENBERG K. , DIRSCHERL W. , et al. ; Z. physiol. Chem. , 202, 1931, 128; "Beiträge zur Chemie des Insulins. 8. Mitteilung über Insulin. "
- 47) GLENCHUR H. et al. ; Ann. intern. Med. , 48, 1958, 1055; "Macroglobulinemia; report of two cases. "
- 48) GORDON A. H. ; Biochem. Biophys. Acta 42, 1960, 23; "A technique for elution of proteins from starch gel. "

- 49) GORDON A.H., REICHARD P.; Biochem. J., 48, 1951, 569;  
"An electrophoretic investigation of the mixture of  
oligonucleotides formed by the encymic degradation of  
deoxyribonucleic acid by Deoxyribonuclease. "
- 50) GOUY G.; J. Physique, 9, 1910, 457; "Sur la constitution de la  
charge électrique à la surface d'un électrolyte. "
- 51) GRABAR P., WILLIAMS C.A.; Biochim. Biophys. Acta 10, 1953,  
193; "Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés  
électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange  
de protéines. Application au sérum sanguin. "
- 52) GRASSMANN W., HANNIG K., KNEDEL M.; Deutsch. Med. Wochen-  
schrift 76, 1951, 333; "Über ein Verfahren zur elektro-  
phoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filger-  
papier".
- 53) GRASSMANN W., HANNIG K.; Hoppe-Seyler, Z. physiol. Chem.  
290, 1952, 1; "Ein quantitatives Verfahren zur Analyse  
der Serumproteine durch Papierelektrophorese. "
- 54) HABICH H.; Schweiz. med. Wchschr. 83, 1953, 1253; "Zur  
Antigenanalyse der Paraproteine bei Makroglobulinämien. "
- 55) HANNIG K.; Hoppe. Seyler, Thierfelder, Handbuch der physiol. -  
pathol. chem. Analyse, Bd. II, 1, 1960, 136;  
"Papierelektrophorese in der Eiweißchemie".
- 56) HELMHOLTZ H.; Gesamte Abhandlungen 1, 1882, 886; "Elektrizität  
von der strömenden Flüssigkeit fortgetrieben".
- 57) HEREMANS J.; Paris, Masson 1960; "Les globulines sériques du  
système gamma. "
- 58) HEREMANS J., HEREMANS M. Th.; Acta med. Scand. Suppl. 367,  
1961, 27; "Studies on abnormal serum globulins (M com-  
pounds) in Myeloma, macroglobulinemia and related  
diseases. "
- 59) HITZIG W.H., ISLIKER H.; Prot. of Biol. fluids, 1960, 368;  
"Immunological studies on dissociation of human macro-  
globulin".
- 60) HOPKINS F.G.; Biochem. J., 19, 1925, 787; "Gluthathione: its  
influence in the oxydation of fats and proteins. "

- 61) ISLIKER H.; Helvet. med. Acta 25, 1958, 41; "Zur Chemie der Makroglobuline".
- 62) ISLIKER H.; Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 17, 1961, 139; "Les macroglobulines du plasma humain."
- 63) JAHNKE K., SCHOTTAN W., HEINZLER F.; Helvet. med. Acta 25, 1958, 25; "Zur Antigenstruktur der Makroglobuline beim Morbus Waldenström."
- 64) JARRIGE P., LAFOSCADE G.; Bull. Soc. Chim. Biol. 41, 1959, 1197; "Elution des protéines après séparation par électrophorèse à travers un gel d'amidon."
- 65) JIRGENSONS B., IKENAKA T., GORGUARAKI V.; Clin. Chim. Acta, 5, 1960, 502; "Chemical studies on a macroglobulin".
- 66) KALDOR G. et al.; J. of Lab. Med. 59, 1962, 970; "Physicochemical studies of a purified macroglobulin (Waldenström)".
- 67) KANZOW V., SCHOLTAN W., MÜTING A.; Klin. Z., 33, 1955, 1043; "Serologische Differenzierung von Makroglobulinämien."
- 68) KAPPELER R., KIEBS A., RIVA G.; Helvet. med. Acta, 25, 1958, 54; "Klinik der Makroglobulinämie Waldenström".
- 69) KNEDEL M., FATEH-MOGHADAM A.; Ergen. Labor. Med. 2, 1965, 137; "Methoden und Ergebnisse der Säulenchromatographie in der klinischen Protein-Chemie".
- 70) KNEDEL M., FATEH-MOGHADAM A.; G.-I.-T. Fachzeitschrift für das Laboratorium, Okt. 1965, 675; "Gradientenelutionschromatographie (Grundlagen, Apparatur, Anwendung)".
- 71) KOHN J.; Clin. Chim. Acta 2, 1957, 297; "A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis."
- 72) KORNGOLD L., LEEUWEN G.; J. Exp. Med., 106, 1957, 467; "Macroglobulinemia. I. The antigenic relationship of path. macroglobulins to normal gamma-globulins."
- 73) KORNGOLD L., LEEUWEN G.; J. Exp. Med. 106, 1957, 477; "Macroglobulinemia. Antisera specific for pathological macroglobulins."
- 74) KORNGOLD L., LEEUWEN G.; J. Exp. Med. 110, 1959, 1; "Macroglobulinemia. III. Effect of mercaptoethanol on the antigenic structure of macroglobulin."

- 75) KÜNZER W.; Klin. Wochenschrift., 37, 1959, 1170; "Zum Verhalten von Erwachsenen-Hämoglobin im Stärkegel nach Hochspannungselektrophorese."
- 76) KUNKEL, H.G., TISELIUS A.; J. Gen. Physiol., 35, 1951, 89; "Electrophoresis of proteins on filter paper,"
- 77) KUNKEL H.G., SLATER R.; J. Clin. Invest. 31, 677, 1952; "Lipoprotein pattern of serum obtained by zone electrophoresis."
- 78) KUNKEL H.G., SLATER R.J.; Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 80, 1952, 42; "Zone electrophoresis in a starch supporting medium".
- 79) KUNKEL H.G., TRAUTMANN R.; J. Clin. Invest., 35, 1956, 641; "The  $\alpha_2$ -lipoproteins of human serum. Correlation of ultracentrifugal and electrophoretic properties."
- 80) LANGE V.; Biochem. Zeitschrift, 333, 1961, 503; "Zur Methode der Zonenelektrophorese im Stärkegel."
- 81) LAURELL C.B.; Acta med. scand, 17, 1961, 17; "Mobilities of M. components in starchgel-electrophoresis."
- 82) LLOYD H.J., MEARES J.D.; Clin. Chim. Acta, 9, 1964, 192; "an electrophoresis for recovery of proteins from starch-gel."
- 83) LORBER A.; The J. of Lab. and clin. Med.; St. Louis; Vol. 64 n° 1, 133; "increased globulin fractionation by an improved vertical gel electrophoretic technique."
- 84) MANDEMA E. v. d.; SCHAAF P.G., HUISMAN Ph.D.; J. Lab. Clin. Med. 45, 1955, 261; "investigations on the amino acid composition of a macroglobulin and a cryoglobulin."
- 85) MARKUS G.; Prot. of biol. fluids, 11. Soll., 1963, 37; "The structural role of disulfide bonds in proteins."
- 86) MATHIES H., SCHLEIFER E., LIEBRICH K.G.; Klin. Wochenschrift. Juli 1963, 653; "Haptoglobulinspiegeluntersuchungen bei Gesunden und Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises."
- 87) MAXWELL L.C., BISCHOFF F., J. Biol. Chem. 112. 135, 215; "Chemical studies on the pituitary gonadotropic hormone."

- 88) METAIS P.A. et al.; Clin. Chim. Acta, 5, 1960, 26;  
"Etude en solution diluée de macroglobulines normales  
et dégradées. "
- 89) MICHAELIS L.; Colloid Chemistry edited by J. Alexander, 1926,  
471;
- 90) MILHAUD G., GOLDBERG G.; Helvet. med. Acta., 17, 1950, 437;  
"La réaction à l'eau distillée dans l'analyse des  
hyperglobulinémies. "
- 91) MILLER E.E., BERNFIELD P.; J. of Chromat. 2, 1959, 519;  
"Influence of the supporting medium on the fractionation  
of protein by zone electrophoresis. "
- 92) MIRSKY A.E., ANSON M.L.; J. Gen. Physiol., 18, 1934, 307;  
"Sulphydryl and disulfide groups of proteins. "
- 93) MORETTI J., BOUSSIER G., YAYLE M.E.; Bull. Soc. Chim. Biol.  
40, 1958, 59; "Nouvelle méthode de purification des  
protéines par l'électrophorèse dans un gel d'amidon. "
- 94) MORTON J.I., DEUTSCH H.F.; J. of Biol. Chem. 231, 1958, 1119,  
"Human serum macroglobulins and dissociation units.  
II. Immunochemical properties. "
- 95) MÜLLER-EBERHARD H.J., KUNKEL H.G.; J. Exptl. Med., 104,  
1956, 253; "The carbohydrate of  $\gamma$ -globulin and  
myeloma proteins. "
- 96) MÜLLER-EBERHARD H.J., KUNKEL H.G., FRANKLIN E.C.; Proc.  
Soc. Exper. Biol. & Med., 93, 156, 146; "Two types  
of  $\gamma$ -globulin differing in carbohydrate content. "
- 97) OLINS D.E., EDELMAN G.M.; J. of Exp. Med. 116, 1962, 635;  
"The antigenic structure of the polypeptide chains of  
human gamma-globulin. "
- 98) OWEN J.A., GOT C., SILBERMAN H.J.; Clin. Chim. Acta, 3,  
1958, 605; "Heterogeneity of serum-myeloma globulins. "
- 99) PAILLETS C. de, MORETTI J., JAYLE M.F.; Bull. Soc. Chim.  
Biol. 41, 1959, 1258; "Purification des protéines par  
électrophorèse à travers un gel d'amidon.  
II. Elimination de l'amidon soluble. "

- 100) PAIN R.H. ; Bioch. J. , 88, 1963, 234; "The molecular weight of the peptide chains of gamma-globulins. "
- 101) PALETTA B. ; Clin. Chim. Acta, 5, 1960, 490; "Verzerrungsfreie Zonen-Elektrophorese im Stärkegel. "
- 102) PEDERSEN K.O. ; Almquist a. Wiksell. Boktrykery A.B. , Upsala 1945; "Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions. "
- 103) PERT J.H. , SLEISENGER M.H. , WOODS K.R. , ENGLE R.L. jr. ; Clin. Res. Proc. 51, 1957, 156; "Requirements for optimal resolving power and reproducibility in protein-fractionation by starch-gel-electrophoresis. "
- 104) PERT J.H. , ENGLE R.E. , WOODS K.R. , SLEISENGER M.H. ; The J. of Lab. and Clin. Med. , Vol. 54, n<sup>o</sup> 4, 1959, 572; "Preliminary studies on quantitative zone electrophoresis in starch gel. "
- 105) PORATH J. , FLODIN P. ; Nature, 183, 1959, 1657; "Gel filtration: a method for desalting and group separation. "
- 106) PORTER R.R. ; Biochem. J. , 73, 1959, 119; "The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain. "
- 107) PORTER R.R. ; Prot. biol. fluids 11. Coll. 1963, 11; "Structure of antibodies. "
- 108) POULIK M.D. ; Nature, 177, 1956, 982; "Tests of purity of diptheria toxins by electrophoresis in starch gel. "
- 109) POULIK M.D. ; Nature, 180, 1957, 1477; "Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. "
- 110) POULIK M.D. ; Fed. Proc. , 17, 1958, 530; "Starch-Gel-Immuno-electrophoresis. "
- 111) POULIK M.D. ; J. Immun. , 82, 1959, 502; "Starch-Gel-Immuno-electrophoresis. "
- 112) POULIK M.D. ; Biochem. Biophys. Acta, 44, 1960, 390; "The use of urea-starch-gel electrophoresis in the studies of reductive cleavage of an  $\alpha_2$ -macroglobulin. "
- 113) POULIK M.D. ; Clin. Chim. Acta, 6, 1961, 493; "Interaction of Tranferrin, Haptoglobulin and other serum proteins with Neuraminidase of diptheria toxin. "

- 114) POULIK M.D.; Nature 191, 1963, 752; "electrophoretic map of chemically derived subunits of papain digested gamma-globulin. "
- 115) POULIK M. D.; Prot. of biol. fluids, 11. Coll., 1963, 385; "Ura-starch gel immunoelectrophoresis. "
- 116) POULIK M. D.; Prot. of biol. fluids, 12 Coll, 1964, 400; "Structural subunits of proteins; a study by two-dimensional starch-gel-electrophoresis. "
- 117) POULIK M. D., SMITHIES O.; Biochem. J., 68, 1958, 636; "Comparison and combination of the starch-gel and filterpaper electrophoretic methode applied to human sera; two diemensional electrophoresis. "
- 118) PUTNAM F.W.; Arch. Biochem., 79, 1959, 67;"Abnormal human serum globulins. I. The nonidentity of Macroglobulins. "
- 119) RAACKE J.D.; Arch. Biochem. Biophys., 62, 1956, 184; "Heterogenity studies on several proteins by means of zone electrophoresis on starch. "
- 120) RAPKINE L; Compt. rend. soc., biol. 112, 790; "Sur l'action de l'acide monoiodacétique sur le glutathione et la cyteine. "
- 121) RAYMOND S., WEINTRAUB L.; Science, 130, 1959, 711; "Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. "
- 122) REISNER C., FRANKLIN E.; J. of Immunol., 87, 1961, 654; "Studies of mercaptoethanl-dissociated normal human 19 S gamma-globulin and pathologic macroglobulins from patients with macroglobulinaemia. "
- 123) RIVA N.; Hans Huber, Bern, Stuttgart 1957; "Das Serumeiweißbild. "
- 124) SAIFER A., ROBIN M., VENTRICE M.; Arch. Biochem. Biophys., 92, 1961, 409; "Starch-gel electrophoresis of purified Albumin. "
- 125) SCHEIDEGGER J.J.; Int. Arch. Allergy, 7, 1955, 103;
- 126) SCHEIDEGGER J.J.; WEBER R., HÄSSIG A.; Helvet. med. Acta 25, 1958, 25; "Zur Antigenstruktur der Makroglobuline beim Morbus Waldenström".

- 127) SCHEURLÉN P. G.; Habil. Schrift Tübingen 1961;  
"Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Urin-  
und Serumeiweiß".
- 128) SCHEURLÉN P. G.; Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 66, 1961, 586;  
"Elektrophoretische Methoden der Serumproteinanalyse."
- 129) SCHEURLÉN P. G.; Verh. dtsch. Ges. inn. Med., 68, 1962, 520;  
"Heterogenität des Plasmocytom-gamma-Globulins."
- 130) SCHEURLÉN P. G.; Z. Naturforsch., 17 b, 1962, 598; "Unter-  
suchungen über die heterogene Zusammensetzung von  
Plasmocytom-gamma-Globulinen".
- 131) SCHEURLÉN P. G.; Klin. Wchschrift., 42, 1964, 986;  
"Nachweis des  $\gamma_{\mu}$ -Plasmocytoms mit der S. G. E."
- 132) SCHEURLÉN P. G.; Klin. Wchschrift. 42, 1964, 935;  
"Untersuchungen über die Heterogenität des  $\gamma_A$ -  
Plasmocytom-Globulins."
- 133) SCHEURLÉN P. G., GOLL R.; Klin. Wchschrift. 39, 1961;  
"Ein Verfahren zur immunologischen Differenzierung  
der mit der S. G. E. getrennten Proteine."
- 134) SCHEURLÉN P. G., TISCHENDORF F. W.; Klin. Wchschrift., 43,  
1965, 18; "Untersuchungen über die Dissoziation von  
gamma-Makroglobulinen durch Cysteamin. II. Elektro-  
phoretische Befunde."
- 135) SCHLEYER M.; Z. Physiol. Chem., Bd., 311, 1958, 29;  
"Messungen des Zeta-Potentials an Trägermaterialien  
für Zonenelektrophorese."
- 136) SCHOBEL B., WEWALKA F.; Prot. of biol. fluids, 5, 1961, 322;  
"Zweidimensionale Stärkegel-Elektrophorese von Serum  
und Urin als Hilfsmittel zur Aufklärung von Paraproteinä-  
mien."
- 137) SCHOLTAN W.; Z. ges. exp. Med., 121, 1963, 574;  
"Klinische Ultrazentrifugenstudien, I. Ultrazentrifugen-  
diagramm des normalen menschlichen Serums."
- 138) SCHULTZE H. E. et al.; Z. Naturforsch. 176, 1962, 313;  
"Untersuchungen über gamma-Makroglobuline des  
menschlichen Serums."

- 139) SEHON A.H. et al.; J. Clin. Invest. 36, 1957, 456;  
"Physicochemical and immunologic studies on macro-  
globulins. "
- 140) SILBERMAN H.J.; Lancet 1957/II, 26; "Multiple myelomatosis and  
macroglobulinaemia. "
- 141) SMITHIES O.; Nature, 175, 1955, 307; "Grouped variations in the  
occurrence of new proteins in normal human serum. "
- 142) SMITHIES O.; Biochem. J., 61, 1955/56, 629; "Zone electrophoresis  
in starch gel: group variations in the serum proteins of  
normal human adults. "
- 143) SMITHIES O.; Advances on Prot. Chem., 14, 1959, 65;  
"Zone electrophoresis in starch gels and its application  
to studies of serum proteins. "
- 144) SMITHIES O.; Biochem. J., 71, 1959, 585; "An improved procedure  
for starch-gel-electrophoresis; further variations in the  
serum proteins of normal individuals. "
- 145) SMITHIES O.; 1. Conf. Genet.; Genetic Inform. and Contr. Prot.  
Struct. and Func.; Princeton, New Jersey 1959; "Discussion  
of genetic control of protein structure by Ingram V. M. "
- 146) SMITHIES O.; Arch. Biochem. Biophys., Suppl. I, 1962, 125,  
"Molecular size and starch-gel-electrophoresis".
- 147) SMITHIES O., POULIK M.D.; Nature, 177, 1956, 1033;  
"Two dimensional electrophoresis of serum proteins. "
- 148) SMITHIES O., HILLER O.; Biochem. J. 72, 1959, 121;  
"The genetic control of Transferrins in humans. "
- 149) SMYTHE C.V.; J. Biol. Chem., 114, 1936, 601; "The reaction of  
iodacetate and of iodacetamide with yeast preparations. "
- 150) STERN O., Z. Elektrochem., 30, 1924, 508; "Zur Theorie der  
elektrolytischen Doppelschicht. "
- 151) SVEDBERG Th., NICHOLS J.B.; J. Am. Chem. Soc. 45, 1923, 2910;  
"Determination of size and distribution of size of  
particle by centrifugal methods. "
- 152) TISCHENDORF F.W., SCHEURLIN P.G. et al.; Verh. dtsch. Ges.  
inn. Med., 70, 1964, 223; "Dissoziation des gamma-Makro-  
globulins durch Cysteamin bei Makroglobulinämie Walden-  
ström und primär chron. Polyarthritis. "

- 153) TISCHENDORF F.W., SCHEURLÉN P.G.; Klin. Wochenschrift., 43, 1965, 493; "Untersuchungen über die Dissoziation von gamma-Makroglobulinen durch Cysteamin. I. Sedimentationsanalytische und viskosimetrische Untersuchungen."
- 154) TISELIUS A., FLODIN P.; Advanc. in Prot. Chem. 8, 1953, 461; "Zone electrophoresis".
- 155) TISELIUS A.; Trans. Faraday Soc., 33, 1957, 524; "A new apparatus of colloidal mixtures."
- 156) VAERMAN J.P. et al.; Prot. of biol. fluids, 11. Coll. 1963, 99; "Paraproteins from transplantable malignancies."
- 157) WALDENSTRÖM J.; 6. Kongr. europ. Ges. Hämatol. Kopenhagen 1957; "A survey is given of the present state of knowledge of macroglobulinaemia."
- 158) WALKER E.; Biochem. J., 19, 1925, 1082; "A colour reaction for disulphides."
- 159) WALLERIUS G., TRAUTMAN R., FRANKLIN E.C. et al.; Fed. Proc., 15, 1956, 378; "Heavy components of human serum."
- 160) WESTENDORF B. et al.; J. Lab. and Clin. Med., 49, 1957, 358; "A serologic investigation of Waldenstroem-Macroglobulinemia by means of the agar diffusion method."
- 161) WHITE A., STERN K.G.; J. Biol. Chem., 117, 1937, 95; "Studies on the constitution of insulin."
- 162) WIELAND Th., FISCHER E.; Naturwissenschaften, 35, 1948, 29; "Über Elektrophorese auf Filterpapier. Trennung von Aminosäuren und ihren Kupferkomplexen."
- 163) WIELAND Th., PFLEIDERER G.; Angew. Chem., 67, 1955, 257; "Analytische und mikropräparative Trägerelektrophorese mit höheren Spannungen".
- 164) WIELAND Th., PFLEIDERER G.; Angew. Chem. 70, 1958, 341; "Verfahren zur Wiedergewinnung von Proteinen aus Trägerschicht -Elektropherogrammen."

- 165) WIENNE R.J.; Rev. belg. Path. 26, 1957, 62;  
"Méthode nouvelle permettant la démonstration  
directe de macroglobulines."
- 166) WIENNE R.J.; Arsica Uitgaven. N.V. Bruxelles, 1959;  
"Studies on agargel electrophoresis."



## LEBENS LAUF

Am 11. 9. 1941 wurde ich als Tochter des Oberverwaltungsgerichtsrats Dr. Heinrich Grube und seiner Frau Friederike, geb. von Axthalb, in Nürnberg geboren.

Dort trat ich im Herbst 1947 in die Volksschule ein. Ab 1951 besuchte ich das Labenwolf-Realgymnasium, ab 1952 das Realgymnasium des Instituts der Englischen Fräulein, Nürnberg.

1954 siedelte unsere Familie nach München über. Die Schulausbildung setzte ich am Realgymnasium des Instituts der Englischen Fräulein, Nymphenburg, fort; dort legte ich im Sommer 1961 die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich im Winter 1961 an der Universität München. Hier belegte ich sämtliche vor-klinischen sowie klinischen Semester. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich nach dem 2. Fachsemester im Oktober 1962, die ärztliche Vorprüfung nach dem 5. Fachsemester im Februar 1964. Mit der Doktorarbeit begann ich im Wintersemester 1964/65.



